

AUS DER POLIKLINIK FÜR ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

DIREKTOR: PROF. DR. G. SCHMALZ

**Die biologische Wirkung von Monomeren zahnärztlicher
Komposite: Charakterisierung induzierter Genmutationen *in
vitro* und molekulare Analyse HPRT-defizienter V79-Zellen**

Habilitationsschrift

zur Erlangung des Grades

eines habilitierten Doktors der Zahnheilkunde

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Dr. rer. nat. Helmut Schweikl

Regensburg, 1997

Danksagung

Die Durchführung der vorliegenden Arbeit war nur mit der großzügigen Anteilnahme und Unterstützung durch den Direktor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie, Herrn Professor Dr. G. Schmalz möglich. Dafür schulde ich ihm großen Dank.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Kirsten Rackebrandt für den immensen Einsatz und die Ausdauer bei der Etablierung des Protokolls für den V79/HPRT-Test und für die Durchführung der zahllosen experimentellen Arbeiten. Ebenso danke ich Frau Brigitte Bey für den Fleiß und die Geduld bei der Erarbeitung des Protokolls für die Durchführung des Ames-Tests und die vielen Experimente, deren Ergebnisse in mehreren Publikationen nachzulesen sind.

Professor Dr. Jonathan Wiest (University of Cincinnati, OH) danke ich sehr herzlich für die vielen Anleitungen und praktischen Hilfestellungen in molekularbiologischen Techniken, die weit über die in der vorliegenden Arbeit benötigten hinausgehen.

Mein Dank gilt auch den Herren Dr. G. Bernhardt (Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie II, Universität Regensburg) und Dr. T. Spruß (Tierschutzbeauftragter der Universität Regensburg) für die Hilfe bei der Präparation der Mikrosomenfraktion. Herrn Andreas Schuster (Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie II, Universität Regensburg) danke ich für die HPLC-Analysen der Kompositmonomere und Herrn Dr. Thomas Reitingner (Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie, Universität Regensburg) für die Diskussionen möglicher Reaktionsmechanismen einzelner Kompositmonomere und die Darstellung der Strukturformeln der Substanzen. Nicht zuletzt danke ich allen Mitarbeitern der Poliklinik, vor allem meinen Laborkolleginnen und Laborkollegen, für Hilfen und Anteilnahme an meiner Arbeit.

Verzeichnis der Abkürzungen

BADGE	Bisphenol A-Diglycidylether
Bis-GMA	Bisphenol A-Glycidylmethacrylat
BisMA	Bisphenol A-dimethacrylat
BPA	Bisphenol A
cm	Zentimeter
DEGDMA	Diethylenglykoldimethacrylat
DMAEMA	Dimethylaminoethylmethacrylat
DMBA	9,10-Dimethyl-1,2-Benzanthracen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGDMA	Ethylenglykoldimethacrylat
EMS	Methansulfonsäureethylester oder Ethylmethansulfonat
FCS	fötales Kälberserum
<i>frameshift</i> -Mutation	Rasterschubmutation
GMA	Glycidylmethacrylat
h	Stunde
HEMA	2-Hydroxyethylmethacrylat
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
<i>hprt</i>	Gen der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
L	Liter
LD50	Dosis einer Testsubstanz, bei der 50% der Versuchstiere sterben
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMA	Methylmethacrylat

MTT	Vitalfarbstoff MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazoliumbromid)
ng	Nanogramm
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> oder Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
S9	Überstand (<i>supernatant</i>) nach Zentrifugation eines Leberhomogenats (9000 xg, 10 min)
sec	Sekunde
TC50	Konzentration, die zu 50% Zelltod führt
TEGDMA	Triethylenglycoldimethacrylat
TETGDMA	Tetraethylenglycoldimethacrylat
U/min	Umdrehungen pro Minute
UDMA	Urethandimethacrylat
V	Volt
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	
Verzeichnis der Abkürzungen	
I Einleitung	10
II Toxizität zahnärztlicher Komposite und experimentelle Methoden ihrer Prüfung (Literaturübersicht)	13
1 Werkstoffkunde zahnärztlicher Komposite	13
1.1 Die Bestandteile der Komposite auf Dimethacrylatbasis	13
1.2 Verfügbarkeit von Kompositmonomeren <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> : Restmonomere	19
2 Biologische Verträglichkeit von Kompositen und Kompositmonomeren <i>in vivo</i>	23
2.1 Akute Toxizität	23
2.2 Lokale Toxizität der Komposite in Gingiva und Pulpa	25
2.2.1 Implantationsstudien mit Kompositen	25
2.2.2 Pulpastudien mit Kompositen	26
2.2.3 Klinische Untersuchungen	29
2.2.4 Allergische Reaktionen nach Kontakt mit Kompositmonomeren	30
3 Biologische Verträglichkeit von Kompositen und Kompositmonomeren <i>in vitro</i>	33
3.1 Prüfmethoden zur Bestimmung der Zytotoxizität zahnärztlicher Komposite	34
3.2 Primäre Zellen und Zellen permanenter Zelllinien	36
3.3 Liegezeit angemischter Komposite und Serumgehalt der Kulturmedien	38
3.4 Dentin-Barriere-Tests	39

4	Effekte subtoxischer Konzentrationen der Kompositmonomere	42
4.1	Östrogene Effekte	42
4.2	Veränderungen der Genexpression	44
4.3	Modifizierung des Lipidstoffwechsels	44
4.4	Modifizierung der Phasen des Zellzyklus	45
4.5	Mutagenität zahnärztlicher Komposite und Dentinkleber	46
4.6	Genmutationstests: Ames-Test und im V79/HPRT-Test	47
4.6.1	Der <i>Salmonella</i> /Mikrosomen-Test (Ames-Test)	48
4.6.1.1	Besonderheiten verschiedener <i>Salmonella</i> -Teststämme	48
4.6.1.2	Die Beziehung von Mutagenität und Kanzerogenität im Ames-Test	50
4.6.2	Genmutationstests mit Säugetierzellen	51
4.6.2.1	Der V79/HPRT-Genmutationstest	51
4.6.2.2	V79-Zellen	54
4.6.2.3	Die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT), das <i>hprt</i> -Gen und die klinische Relevanz einer HPRT-Defizienz	55
5	Deletionsscreening des <i>hprt</i> -Gens in V79-Zellen mit Polymerase Chain Reaction	57
III	Fragestellung	60
IV	Ergebnisse und Diskussion eigener Untersuchungen zur Zytotoxizität und Mutagenität von Kompositmonomeren	62
1	Zytotoxizität von Kompositmonomeren in V79-Zellen	62
1.1	Zellarten, Expositionszeiten und TC50-Werte der Kompositmonomere	65
1.2	Lösungsmittel und TC50-Werte der Kompositmonomere	67
1.3	Physiologisch relevante toxische Konzentrationen der Kompositmonomere	69

2	Die Mutagenität von Monomeren zahnärztlicher Komposite im Ames-Test	72
2.1	Die Basismonomere Bisphenol A-Glycidylmethacrylat (Bis-GMA) und Urethandimethacrylat (UDMA) im Ames-Test	72
2.2	Methylmethacrylat und 2-Hydroxyethylmethacrylat im Ames-Test	74
2.3	Bisphenol A im Ames-Test	75
2.4	Glycidylmethacrylat im Ames-Test	76
2.5	Das Comonomer Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) im Ames-Test	77
3	Die Mutagenität von Monomeren zahnärztlicher Komposite im V79/HPRT-Test	80
3.1	Das Basismonomer Bisphenol A-Glycidylmethacrylat (Bis-GMA) im V79/HPRT-Test	81
3.2	Das Basismonomer Urethandimethacrylat (UDMA) im V79/HPRT-Test	83
3.3	Methylmethacrylat im V79/HPRT-Test	84
3.4	2-Hydroxyethylmethacrylat im V79/HPRT-Test	86
3.5	Bisphenol A im V79/HPRT-Test	87
3.6	Glycidylmethacrylat im V79/HPRT-Test	89
3.7	Das Comonomer Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) im V79/HPRT-Test	90
4	Vergleichende Diskussion der Mutagenität und Genotoxizität von Monomeren zahnärztlicher Komposite	92
4.1	Die Basismonomere Bis-GMA und UDMA	94
4.2	Die Monomere Methylmethacrylat und 2-Hydroxyethylmethacrylat	95
4.3	Bisphenol A	97
4.4	Glycidylmethacrylat	98

4.5	Das Comonomer Triethylenglykoldimethacrylat (TEGDMA)	103
5	Molekulare Analyse TEGDMA-induzierter HPRT-defizienter V79-UL-Zellen mit Polymerase Chain Reaction	109
5.1	TEGDMA-induzierte Mutationen im <i>hprt</i> -Gen	109
5.2	Mechanismus der Induktion von V79-UL-Mutanten durch TEGDMA: Michael-Addition	114
5.3	Vergleichende Analyse der Induktion von Deletionen im HPRT-Gen	118
6	Strategien und Normen für die Durchführung von Genotoxizitätsprüfungen	122
6.1	Strategien der Genotoxizitätsprüfung	122
6.2	Standardprüfverfahren: Nationale und internationale Normen zur Prüfung der Gewebeverträglichkeit von Medizinprodukten	125
6.3	Extrapolation genotoxischer Befunde auf den Menschen	127
6.4	Einschätzung der Mutagenität der geprüften Kompositmonomere	128
V	Experimentelle Einzelheiten	131
1	Materialien	131
1.1	Chemikalien und Reagenzien	131
1.2	Lösungen, Medien und Puffer	132
1.2.1	Lösungen für Zellkultur, Zytotoxizitätstest und HPRT-Test	132
1.2.2	Lösungen für die <i>Salmonella</i> -Kulturen und den Ames-Test	133
1.3	DNA-Isolierung und Elektrophorese	135
1.4	Primer für die Polymerase Chain Reaction	135
1.5	Geräte, Instrumente und einfache Hilfsmittel	137
2	Methoden	139
2.1	Chemische Analyse der Testsubstanzen	139

2.2	Präparation einer Mikrosomenfraktion (S9 Fraktion) aus der Rattenleber	139
2.3	<i>Salmonella</i> /Mikrosomen-Test (Ames-Test)	140
2.3.1	Kultivierung der <i>Salmonella typhimurium</i> -Stämme	140
2.3.2	Experimente zur Mutagenität der Kompositmonomere in <i>Salmonella typhimurium</i>	141
2.4	Zellkultur	143
2.4.1	Routinekultur der V79-Zellen	143
2.4.2	Zytotoxizität der Kompositmonomere	143
2.5	HPRT-Test	145
2.5.1	HPRT-Test ohne Zusatz einer Mikrosomenfraktion (24 Stunden Exposition)	145
2.5.2	HPRT-Test mit und ohne Mikrosomenfraktion (4 Stunden Exposition)	146
2.6	Isolierung spontaner und TEGDMA-induzierter HPRT-defizienter V79-UL-Zellklone	149
2.7	Analyse TEGDMA-induzierter V79-UL-Mutanten mit Polymerase Chain Reaction	150
2.7.1	Isolierung genomischer DNA aus spontanen und TEGDMA-induzierten V79-UL-Mutanten	150
2.7.2	Durchführung der PCR-Analysen	151
2.7.3	Gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten <i>hprt</i> -Exonsequenzen	152
VI	Zusammenfassung	154
VII	Literaturverzeichnis	157

I Einleitung

Acrylate und methylsubstituierte Acrylate, Epoxide und Bisphenol A-Derivate werden in der gesamten Polymerchemie zur Produktion synthetischer Gebrauchsgegenstände des täglichen Lebens verwendet (Ehrenberg und Hussain, 1981; Andrews und Clary, 1986; Feldman und Krishnan, 1995). Zu diesen Produkten zählen auch zahnärztliche Komposite. Neben Kriterien der Verarbeitung oder der Haltbarkeit ist auch die Gewebeverträglichkeit für den klinischen Erfolg eines zahnärztlichen Materials bedeutsam. Aufgrund zahlreicher *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen werden Komposite und Kompositmonomere als mäßig toxisch eingestuft. Daten zur potentiellen Mutagenität der Materialien liegen allerdings in der zugänglichen Literatur kaum vor (Schmalz, 1985; Geurtsen, 1988; Schmalz, 1995).

Die vorliegende Arbeit beschreibt die biologischen Eigenschaften zahnärztlicher Komposite auf Dimethacrylatbasis. Chemisch-physikalische Aspekte, die für die klinische Verwendung zahnärztlicher Komposite bedeutsam sind, wurden andernorts vielfach und ausführlich beschrieben (Viohl *et al.*, 1986; Peutzfeldt, 1997). Die Werkstoffkunde der Materialien wurde deshalb hier nur in dem Umfang erörtert, wie es zum Verständnis und zur Diskussion der biologischen Eigenschaften zahnärztlicher Komposite und der Kompositmonomere notwendig war. Unter der Bezeichnung Kompositmonomere wurden hier auch Glycidylmethacrylat und Bisphenol A subsumiert, die beiden Ausgangssubstanzen für die Synthese des Basismonomers Bisphenol A-Glycidylmethacrylat.

Die Beschreibung der biologischen Eigenschaften konzentrierte sich auf die eigenen Untersuchungen zur Mutagenität von Kompositmonomeren in einem bakteriellen Testsystem (Ames-Test) und in Säugetierzellen (V79/HPRT-Test). Für beide Systeme liegen seit vielen Jahren experimentelle Erfahrungen aus dem Gebiet der genetischen Toxikologie vor (Bradley *et al.*, 1981; Maron und Ames, 1983; Nestmann *et al.*, 1991). Die Prüfung der Zytotoxizität der

Kompositmonomere in V79-Zellen diene hier dazu, den wirksamen Konzentrationsbereich für die nachgelagerten Prüfungen der Mutagenität der Substanzen einzugrenzen.

Die vorliegende Arbeit geht in den Analysen der mutagenen Eigenschaften von Kompositmonomeren über die generellen Empfehlungen, die nationale und internationale Normen zur Prüfung der Gewebeverträglichkeit von Medizinprodukten in der Zahnheilkunde geben, hinaus (ISO 1992a; ISO 1992b; ISO 1997). Die Anwendung der hier beschriebenen Methoden, des Ames-Tests und des HPRT-Tests mit V79-Zellen, ist zwar in den Normen impliziert, allerdings gibt es für den HPRT-Test und jeden anderen Genmutationstest mit Säugetierzellen bisher keine experimentellen Erfahrungen für das Fachgebiet der Zahnheilkunde. Die vorliegende Arbeit beschränkt sich nicht allein auf die Analyse der mutagenen Aktivitäten der Kompositmonomere. Eine erste Charakterisierung substanz-induzierter Mutanten der V79-Zellen wurde auf molekularer Ebene vorgenommen, um so Hinweise auf die Art der induzierten Mutationen zu gewinnen.

Die experimentellen Untersuchungen, die hier beschrieben sind, wurden in den großen Rahmen der bisher gesammelten Daten zur Gewebeverträglichkeit der zahnärztlichen Komposite und Kompositmonomere gestellt. Eine angemessene Darstellung des aktuellen Kenntnisstandes der biologischen Eigenschaften zahnärztlicher Komposite und ihrer Hauptkomponenten erklärt die Stellung der vorliegenden Untersuchungen im Gesamtzusammenhang. Die Frage nach der klinischen Bedeutung der hier erzielten Ergebnisse zur Mutagenität von Kompositmonomeren führte auf ein bisher unbearbeitetes Feld im Bereich der Prüfung der biologischen Verträglichkeit zahnärztlicher Werkstoffe überhaupt. Die Diskussion beginnt deshalb mit der Darstellung von Strategien zur Mutagenitätsprüfung und Ansätzen und Erfahrungen aus der klassischen Toxikologie zur Extrapolation experimenteller Befunde (*in vitro* und *in vivo*) auf den Menschen.

Die vorliegende Arbeit entstand mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) in Form einer Sachbeihilfe.

II Toxizität zahnärztlicher Komposite und experimentelle Methoden ihrer Prüfung (Literaturübersicht)

1 Werkstoffkunde zahnärztlicher Komposite

1.1 Die Bestandteile der Komposite auf Dimethacrylatbasis

Zahnärztliche Kompositfüllungsmaterialien auf Dimethacrylatbasis sind Werkstoffe, die aus mindestens zwei chemisch verschiedenen Komponenten, einer Kunststoffmatrix und Füllstoff, bestehen, und deren chemische Haftung über Kopplungsagenzien vermittelt wird (Bowen, 1956; Bowen, 1958; Bowen, 1979; Viohl *et al.*, 1986; Bowen und Marjenhoff, 1992). Zusätzliche Komponenten dienen dazu, die sehr hohe Viskosität der Matrixsubstanzen zu senken, die Monomer-Polymer-Konversion zu starten (chemisch oder photochemisch), zu beschleunigen oder zu hemmen und die Stabilität und die Farbechtheit der Werkstoffe zu bewahren. Die mengenmäßige Zusammensetzung der Einzelkomponenten und ihr Polymerisationsgrad bestimmen die Summe der Materialeigenschaften der zahnärztlichen Komposite. Der klinische Erfolg eines Komposites beruht einerseits auf den so erzielten chemischen und physikalischen Eigenschaften, andererseits aber auch auf der biologischen Verträglichkeit des Materials.

Die Kunststoffmatrix besteht aus hochmolekularen hochviskösen Monomeren. Überwiegend werden das Bisphenol A-Glycidylmethacrylat (Bis-GMA, Bis-4(2-hydroxy-3-methacryloxypropyloxy)-phenyl-propan), das Reaktionsprodukt aus Bisphenol A und Glycidylmethacrylat, und das Urethandimethacrylat (UDMA) verwendet (Ruyter, 1985; Peutzfeldt, 1997). Bisphenol-Dimethacrylat (Bis-DMA), Bisphenol A-Diethylmethacrylat (Bis-EMA) und Bisphenol A-Dipropylmethacrylat (Bis-PMA) wurden neben anderen Bisphenol A-Derivaten als Matrixkunststoffe entwickelt, jedoch nur vereinzelt verwendet (Bowen, 1979; Viohl *et al.*, 1986). Die

Bisphenol A-Derivate gehören zur Gruppe der aromatischen Dimethacrylate, während die Urethandimethacrylate aliphatischer Natur sind. Das hohe Molekulargewicht des Bis-GMA bewirkte eine gegenüber reinen Methylmethacrylaten geringere Polymerisationsschrumpfung der Füllungskunststoffe. Sie beträgt etwa 1-5 Volumenprozent für die kompletten Materialien, bei reinen Bis-GMA-Monomeren etwa 10%. Die Polymerisationsschrumpfung reiner Methylmethacrylatmonomere hingegen kann etwa 20 Volumenprozent erreichen (Bowen, 1979; Glenn, 1982; Goldman, 1983). Die Hydroxylgruppen des Monomers erhöhen dessen Hydrophilie, die zu erhöhter Wasseraufnahme in die Kunststoffmatrix und folglich zu meist schlechteren Materialeigenschaften führt (Viohl *et al.*, 1986).

Den Matrixmonomeren Bis-GMA und UDMA wurden wegen ihrer hohen Viskosität niedrig-molekulare Verdünner (Comonomere) zugesetzt. Komposite ließen sich so besser verarbeiten und die Mengen an Füllstoffen (siehe unten), die zugeführt werden, konnten erhöht werden. Man verwendet als Comonomere Methacrylate oder Dimethacrylate. Sie polymerisieren mit den Matrixmonomeren und werden so in den Kunststoff eingebaut. Das am häufigsten verwendete Comonomer ist das Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA), andere Comonomere werden bei speziellen Anwendungen eingesetzt (Bowen, 1979; Viohl, *et al.*, 1986, Peutzfeldt, 1997). Das Mengenverhältnis von Matrixmonomer und Comonomer bestimmt wesentlich die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Komposites. Wird der Verdünner im Überschuß gegeben, führt dies zu sehr flüssigen Kompositen und in der Folge davon zu geringeren Raten der Monomer-Polymer-Konversion, starker Polymerisationsschrumpfung und Randspaltbildung (Brauer *et al.*, 1981; Rueggeberg und Tamareselvy, 1995).

Der Zusatz von Füllstoffen (reinforced fillers) verleiht den modernen zahnärztlichen Kompositen verglichen mit den nichtgefüllten Kunststoffen überlegene Materialeigenschaften (Bowen, 1979). Die Füllstoffe unterscheiden sich nach Form und Größe, chemischer Zusammensetzung und

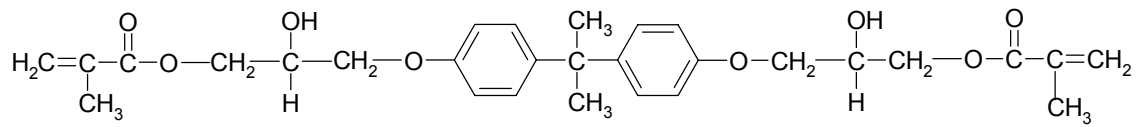
Oberflächenbeschaffenheit. Neben Quarzpulver (SiO_2) werden den Kompositen heute vor allem verschiedenste Silikate unterschiedlicher Mengenverhältnisse als Splitter oder Kugeln, Glaskeramiken oder Metalloxide zugesetzt (Oysaed und Ruyter, 1986; Dermann *et al.*, 1995; Ruyter, 1995.) Die Teilchengröße moderner Füllstoffe liegt zwischen 0,5 und 30 μm . Mikrofeine oder kolloidale Füllstoffe mit Partikeln von weniger als 50 nm, die jedoch leicht aggregieren, ermöglichen optimale Polierbarkeit. Der Füllgrad moderner Komposite liegt zwischen 65 bis 70 Volumenprozent. Durch die verschiedenen Kombinationen der Füllstoffe soll ein möglichst hoher Füllgrad erreicht werden. Dadurch kann die Polymerisationsschrumpfung drastisch gesenkt, der thermische Ausdehnungskoeffizient gesenkt und die Zug- und Druckfestigkeit erheblich verbessert werden (Viohl *et al.*, 1986; Dermann *et al.*, 1995). Die vorteilhaften mechanischen Eigenschaften von gefüllten Kompositen basieren auf einer möglichst vollständigen und dauerhaften chemischen Verbindung zwischen den organischen Monomeren und den anorganischen Füllstoffen. Als Haftvermittler (Kopplungsagenzien) fungieren trifunktionale Alkoxysilane, beispielsweise 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan (MPTMS) (Bowen, 1979; Viohl *et al.*, 1986). Si-OH-Gruppen stellen die Verbindung zur Füllstoffoberfläche her, die ungesättigten Vinyl- oder Methacrylgruppen polymerisieren mit den Basismonomeren und Comonomeren.

Funktionelle Kompositwerkstoffe entstehen nach Monomer-Polymer-Konversion, die chemisch und photochemisch ausgelöst werden kann. Im Falle der chemischen Härtung startet ein Initiator die radikalische Kettenpolymerisation der Basismonomere und Comonomere mit der Bildung freier Radikale (Bowen, 1979). Dibenzoylperoxid (DBP) ist ein häufig verwendeter Initiator, der im Zusammenwirken mit einem tertiären aromatischen Amin als Redoxpartner die Polymerisationsreaktion beschleunigt. Dieses Redoxsystem ist bereits in sichtbarem Licht und bei Raumtemperatur sehr reaktiv (Viohl *et al.*, 1986.). UV-A-Strahlung oder sichtbares Licht im blauen Bereich setzen Radikale für die Initiierung der Härtung photopolymerisierender

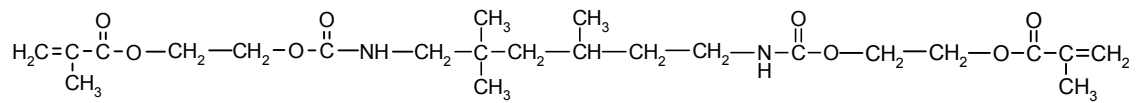
Komposite frei. Benzoinalkylether (BAE), ein Ketoether und Campherchinon, ein 1,2-Diketon, sind gebräuchliche Photoinitiatoren (Bowen, 1979; Viohl *et al.*, 1986; Bowen *et al.*, 1996). Polymerisationsinhibitoren verhindern die unter normalen Lagerbedingungen auftretende spontane Polymerisation der Dimethacrylatmonomere und verzögern die Reaktionsgeschwindigkeit während des Verarbeitens der Werkstoffe (Bowen, 1979). Man verwendet in der Regel Substanzen, die sich vom Phenol ableiten. Der Monomethylether des Hydrochinons (HQME) verhindert bereits in sehr geringer Konzentration in Anwesenheit von O₂ die spontane Polymerisation der Dimethacrylate. Eine andere, sehr wirksame Substanz ist das butylierte Hydroxytoluol. Die Zersetzung der Komposite und der Verlust ihrer Farbstabilität soll durch UV-Stabilisatoren minimiert werden. Es werden Verbindungen verwendet, die mehrere konjugierte Doppelbindungen und aromatische Ringe enthalten und die deshalb in der Lage sind, UV-Strahlung zu absorbieren (Bowen 1979, Viohl *et al.*, 1986). Die typische Zusammensetzung eines chemisch härtenden Komposites mit Bis-GMA als Basismonomer zeigt Tabelle 1. Diese Zusammensetzung wurde in den letzten Jahren mitunter in verschiedenen Werkstoffen modifiziert, es wurden jedoch keine wesentlichen Veränderungen entwickelt. Abbildung 1 sind die chemischen Strukturformeln derjenigen Substanzen zu entnehmen, deren Zytotoxizität und Mutagenität in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

Tabelle 1: Zusammensetzung eines chemisch härtenden Komposites (aus Viohl *et al.*, 1986). Die Zahlen sind Angaben in Massenprozent.

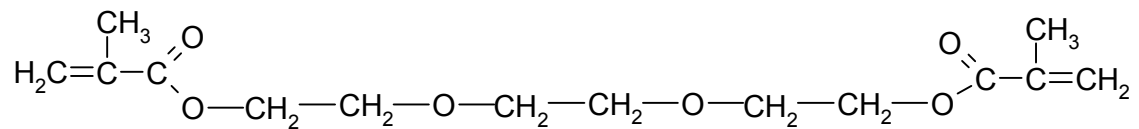
Bestandteil	Masse	chemische Verbindung
Monomer	15	Bis-GMA / Iso-Bis-GMA
Comonomer	9	TEGDMA
Füllstoff	75	Barium-Aluminium-Glas
Haftvermittler		3-Methacryloxypropyltri-methoxysilan
Initiator	0,3	Dibenzoylperoxid
Akzelerator	0,2	N,N-Dihydroxyethyl-para-toluidin
Inhibitor	0,005	Jonol
UV-Stabilisator	0,5	2-Hydroxy-4-methoxy-benzophenon



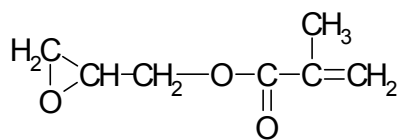
Bis-GMA



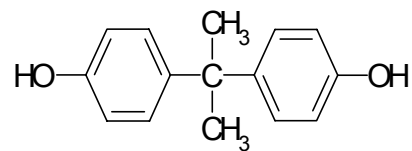
UDMA



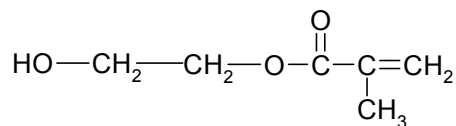
TEGDMA



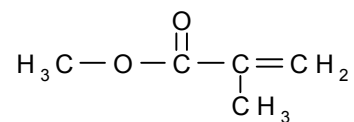
Glycidylmethacrylat



Bisphenol A



HEMA



Methylmethacrylat

Abb. 1: Chemische Strukturen der analysierten Kompositkomponenten.

1.2 Verfügbarkeit von Kompositmonomeren *in vitro* und *in vivo*: Restmonomere

Die Polymerisation (Monomer-Polymer-Konversion) zahnärztlicher Komposite ist nie vollständig, weil nicht alle Methacrylatgruppen der Dimethacrylatmonomere reagieren (Ruyter und Seendsen, 1978; Ruyter, 1984). Der Grad der Monomer-Polymer-Konversion liegt bei etwa 65-70% mit Extremwerten von 35% bis 80% (Antonucci und Toth, 1983; Asmussen, 1982; Ruyter und Oysaed, 1987; Chung und Greener, 1988; Spahl *et al.*, 1991, Ferracane, 1994). Die Art der Initiierung der Monomer-Polymer-Konversion ist anscheinend für die Konversionsraten ohne Bedeutung, diejenigen für lichthärtende und chemisch aushärtende Kunststoffe unterscheiden sich nicht wesentlich (Ferracane und Greener, 1984; Ruyter, 1985). Ein hoher Anteil an Monomeren und kurzkettigen Polymeren sollte demnach auch in ausgehärteten Kompositen ungebunden vorliegen. Diese Restmonomere könnten *in vivo* durch den Speichel ausgelaugt werden und damit zum einen die Stabilität des Kunststoffes beeinträchtigen, zum anderen unerwünschte systemische oder lokale biologischen Reaktionen verursachen. Die Art und die Menge nicht-polymerisierter freier Kompositmonomere, ihre Auslaugung und Verfügbarkeit wurde in der Literatur mehrfach beschrieben.

Monomere stellen den weitaus höchsten Anteil der nicht-polymerisierten Kompositkomponenten. Der Anteil freier Restmonomere in einem chemisch härtenden Komposit, der nach dem Aushärten in Tetrahydrofuran extrahierbar war, wurde mit 0,5 bis 1,2 % des ursprünglichen Gewichtes angegeben. Nur etwa 10% davon sollten in Wasser über einen Zeitraum von zwei Wochen extrahiert werden (Inoue und Hayashi, 1982). Etwas höhere Werte freier Monomere ermittelte man in Extrakten eines lichthärtenden Komposites unmittelbar nach dem Aushärten. Innerhalb von 24 Stunden konnten etwa 1,5% der freien Kompositmonomere in Wasser und bis zu 2% in einem Wasser/Ethanol-Gemisch nachgewiesen werden (Ferracane und Condon, 1990). Sind Komposite erst vollständig ausgehärtet und wird danach extrahiert, sinken diese

Werte etwa um den Faktor 2 (Pearson und Longman, 1989). In organischen Lösungsmitteln wie Ethanol, Chloroform oder Toluol stieg der Anteil freier extrahierbarer Monomere nach 7 Tagen auf bis zu 11% (Rathbun *et al.*, 1991). Organische Lösungsmittel durchdringen die organische Matrix des Komposites leichter als Wasser und steigern damit die Freisetzung ungebundener Monomere (Ferracane, 1994).

Als eluierbare Restmonomere der heute gebräuchlichen Komposite wurden Bisphenol A-Glycidylmethacrylat (Bis-GMA), Urethandimethacrylat (UDMA), Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) und 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) in wäßrigen Medien nachgewiesen (Okamoto *et al.*, 1986; Geurtsen, 1988; Baker *et al.*, 1988; Tanaka *et al.*, 1991; Gerzina *et al.*, 1991; Hume *et al.*, 1993; Ferracane, 1994).

Bisphenol A, Bisphenol A-Dimethacrylat, Bisphenol A-Diglycidylether und Bis-GMA wurden aus einem Komposit (Fissurenversiegler) ausgelaugt und in Speichelproben nachgewiesen (Olea *et al.*, 1996). Neben diesen Monomeren wurden in Wasser und Methanol auch Initiatoren, Aktivatoren und Inhibitoren lichthärtender Komposite eluiert (Spahl *et al.*, 1991). Methylmethacrylat (MMA) wurde aus zahnärztlichen Prothesenmaterialien auf Acrylbasis in den Speichel und in Lösungen mit pufferähnlicher Zusammensetzung abgegeben (Tsuchiya *et al.*, 1994). MMA konnte in Zellkulturmedium teilweise in höheren Mengen extrahiert werden als in reinem Wasser (Shintani, 1995). Diese Untersuchungen deuten darauf hin, daß sämtliche Kompositmonomere extrahiert werden können.

Die Extraktion von Restmonomeren erfolgte nicht linear über die Zeit. Etwa 75% der eluierbaren Substanzen wurden bereits innerhalb weniger Stunden freigesetzt, der größte Teil der eluierbaren Substanzen war bereits nach einem Tag Liegezeit in Wasser oder Ethanol/Wasser aus einem Komposit ausgelaugt (Ferracane und Condon, 1990; Ferracane, 1994). Nach 7

Tagen war die Zunahme der extrahierten Bis-GMA und TEGDMA-Mengen gering (Tanaka *et al.*, 1991). Prothesenkunststoffe enthielten fünf Tage nach Polymerisation noch etwa 1-5% restliches Methylmethacrylat (Ruyter und Oysaed, 1982).

TEGDMA machte den größten Anteil der extrahierbaren Monomere eines Komposites auf Bis-GMA-Basis aus. Das Verhältnis der extrahierbaren TEGDMA- und Bis-GMA-Mengen zur Gesamtmenge der Restmonomere sank in einem lichtgehärteten Kunststoff drastisch, wurde die Bestrahlung mit Licht von 30 s auf 50 s verlängert. Die extrahierbaren TEGDMA-Mengen sanken von 1,5% der Ausgangsmenge des Comonomers auf etwa 0,5%, die Menge an extrahiertem Bis-GMA fiel von etwa 0,1% auf 0,05% (Tanaka *et al.*, 1991).

Als Nebenprodukt des Methylmethacrylats kann durch Oxidation Formaldehyd in geringen Mengen entstehen, die jedoch ausreichen könnten, allergische Reaktionen auszulösen (Ruyter, 1980; Ruyter, 1995). Formaldehyd wurde in zytotoxischen Konzentrationen aus einem Prothesenmaterial in Speichel extrahiert (Tsuchiya, *et al.*, 1994). Die freigesetzten Mengen sanken mit der Liegezeit, die Substanz war jedoch sogar nach mehr als hundert Tagen noch nachweisbar (Oysaed *et al.*, 1988).

Wichtig für die Beurteilung der biologischen Verträglichkeit der Komposite war auch das Wissen um das Maß ihrer Biodegradation durch das Mundhöhlenmilieu und die Auslaugung dieser Abbauprodukte. Dimethacrylatpolymere wurden enzymatisch abgebaut und setzten daraufhin Methacrylsäure frei (Munksgaard und Freund, 1990; Koda *et al.*, 1990). Der enzymatische Abbau von Kompositen, der direkt an der äußeren Oberfläche der Materialien beginnen kann, resultierte in einer reduzierten Oberflächenhärte des Materials (Freund und Munksgaard, 1990; Larsen *et al.*, 1992; deGee *et al.*, 1996). Weitergehende Degradationsprozesse sind deshalb in der Folge wahrscheinlich.

Von praktischer klinischer Relevanz ist der Einfluß des Dentins auf die Diffusion ausgelaugter Kompositmonomere in die Pulpahöhle (Hanks *et al.*, 1994; Hamid und Hume, 1997). Die Freisetzung von TEGDMA und HEMA aus Kompositen durch menschliches Dentin hindurch wurde auch *in vitro* gemessen (Gerzina und Hume, 1996). Innerhalb der ersten 24 h nach Applikation des Materials auf Dentin war die Menge des ausgelaugten TEGDMA auf weniger als 1% derjenigen Menge reduziert, die direkt in Wasser abgegeben wurde. Allerdings stieg dieser prozentuale Anteil des durch Dentin diffundierten TEGDMAs bereits nach 3 Tagen auf etwa 60% des frei in Wasser extrahierten Materials (Gerzina und Hume, 1994). Dentin schien also die Verfügbarkeit von TEGDMA in der Pulpahöhle nicht vollständig zu eliminieren, sondern lediglich zeitlich zu verzögern. Auch Bis-GMA diffundierte über menschliches Dentin in die Pulpakammer *in vitro* (Al-Fawaz *et al.*, 1993). Der Gewebedruck scheint allerdings der Diffusion des HEMA, das in höheren Mengen als TEGDMA durch Dentin diffundiert, und des TEGDMA entgegenzuwirken (Gerzina und Hume, 1995). Für HEMA wurde in mit EDTA geätztem Dentin ein Permeabilitätskoeffizient von etwa 0,0003 cm/min *in vitro* (Pulpakammer) gemessen. Wurde in diesem offenen System ein in der Pulpa physiologisch wirksamer Gegendruck (10 cm Wassersäule) angelegt, sank die HEMA-Konzentration nach Diffusion durch eine 0,5 cm dicke Dentinscheibe etwa um den Faktor 6000 (Bouillaguet *et al.*, 1996).

2 Biologische Verträglichkeit von Kompositen und Kompositmonomeren *in vivo*

2.1 Akute Toxizität

Für die Kompositmonomere, deren Mutagenität im *Salmonella*-Mikrosomen-Test (Ames-Test) und deren Zytotoxizität und Mutagenität in V79-Zellen in der vorliegenden Arbeit geprüft wurden, liegen in den allgemein zugänglichen Literaturlatenbanken nur wenige Angaben zur akuten Toxizität *in vivo* (LD50-Werte) vor. Die akute orale LD50 (Ratte) des Methylmethacrylats (MMA) liegt nach Herstellerangaben bei 7872 mg/kg (Schuchardt, 1994a). In der Literatur findet man mit 8,4 g/kg einen etwas höheren Wert (Deichmann, 1941). Nach vierstündiger Exposition (Inhalation) wurde die LC50 mit 7093 ppm angegeben (Borzelleca *et al.*, 1964; Tansy und Kendall, 1979). Die LD50 für Methylmethacrylat in Luft wurde für Mäuse nach dreistündiger Exposition auf etwa 55 mg/l geschätzt (Spealman *et al.*, 1945). Mit 45-50 mg/l lag die für Ratten ermittelte LD50 nach einer etwas kürzeren Expositionszeit im selben Konzentrationsbereich. Nach Aufnahme über die Haut wurde die LD50 mit 10 ml/kg angegeben, nach intraperitonealer Applikation mit etwa 1,3 ml/kg (Autian, 1975; Singh *et al.*, 1972). Die Substanz wirkt reizend auf Augen, Atmungsorgane sowie auf die Haut und kann Ätzungen verursachen. Eine Sensibilisierung nach Einatmen und nach Hautkontakt ist möglich (Schuchardt, 1994a; Sigma, 1994). Der MAK-Wert (Maximale Arbeitsplatzkonzentration) für MMA beträgt 50 ml/m³ (50 ppm) oder 210 mg/m³ (Schuchardt, 1994a; DFG, 1997).

Nach Herstellerangaben liegen die LD50-Werte für Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) bei 5900 mg/kg (oral, Maus), für Glycidylmethacrylat (GMA) bei 597 mg/kg (oral, Ratte) und 469 mg/kg (dermal, Kaninchen) (Schuchardt, 1994b; Schuchardt, 1994c). Die LD50 für Triethylenglycol-dimethacrylat (TEGDMA) wird mit 10837 mg/kg (oral, Ratte) und 10750 mg/kg (oral, Maus)

angegeben (Sigma, 1995). Die akute orale LD50 (Ratte) beträgt für die Basismonomere Bis-GMA und UDMA mehr als 5000 mg/kg (Röhm 1996a; Röhm 1996b). Nach Angaben der Hersteller können die Substanzen mit Ausnahme der Basismonomere Haut und Augen reizen, manche dieser Substanzen scheinen eine Sensibilisierung nach Hautkontakt zu verursachen (siehe unten). Struktur-Aktivitätsanalysen erbrachten Hinweise darauf, daß niedrigmolekulare Substanzen über die Haut besser aufgenommen werden als über den Gastrointestinaltrakt. Werden multifunktionale Acrylate und Methacrylate oral verabreicht, sinkt die akute Toxizität mit steigendem Molekulargewicht der Substanzen (Autian, 1975; Andrews und Clary, 1986; Greim *et al.*, 1995).

Die Toxizität des Bisphenol A (BPA) ist gut charakterisiert. Laut Angaben der Hersteller beträgt die LD50 3250 mg/kg (oral, Ratte) oder 3000 mg/kg (dermal, Kaninchen) (Schuchardt, 1994d). BPA kann in Ratten und Mäusen die Embryonalentwicklung stören und mitunter im blutbildenden System kanzerogen wirken (Hardin *et al.*, 1981; NTP, 1982; Morrissey *et al.*, 1987; Ashby und Tennant, 1988). Die Aufnahme von BPA über die Haut kann beim Menschen zu Schäden an Niere, Leber, Milz, Pankreas und Lunge führen (Sax, 1975).

Die hier angeführten LD50-Werte der verschiedenen Kompositmonomere lassen sich besser einordnen, vergleicht man sie mit den LD50-Werten anderer bekannt toxischer Substanzen. Beispielsweise wurden für Phenobarbital, Nikotin und Dioxin (TCDD) LD50-Werte von 150, 1, und 0,001 mg/kg ermittelt (Klassen, 1986).

2.2 Lokale Toxizität der Komposite in Gingiva und Pulpa

2.2.1 Implantationsstudien mit Kompositen

Effekte von Kompositmaterialien auf die Gingiva oder andere Gewebe der Mundhöhle können verschiedenen Ursprungs sein. Zum einen können Entzündungen als Folge von Ablagerungen bakterieller Plaque auf Oberflächen von Kompositrestaurationen auftreten. Die Gewebe können jedoch auch aufgrund der bei der Polymerisation der Komposite eintretenden Wärmeentwicklung geschädigt werden. Zum anderen werden Substanzen wirksam, die unmittelbar nach der Polymerisation aus dem Komposit freigesetzt werden können oder die aufgrund von Biodegradation aus dem Material ausgelaugt werden (Schmalz, 1985). Zur Erfassung möglicher toxischer Effekte von Kompositen oder Kompositmonomeren auf die menschliche Gingiva oder auch die Mundschleimhaut werden *in vivo* vor allem Implantationsversuche, meist an Ratten oder Kaninchen, durchgeführt (Schmalz, 1985).

Subkutane, intramuskuläre oder intraossäre Implantate von Kompositwerkstoffen führten nach verschiedenen Expositionszeiten zu leichten bis mäßig toxischen Reaktionen im Gewebe (Mjör *et al.*, 1977; Welker *et al.*, 1977; Schmalz und Schmalz, 1981; Schmalz und Bühler, 1983; Wennberg *et al.*, 1983). Mit zunehmender Liegezeit im Gewebe nahm die Toxizität polymerisierter Werkstoffe ab, jedoch wurden auch chronische Gewebeentzündungen nach Expositionszeiten von 4 Wochen bis zu drei Monaten beobachtet (Chan *et al.*, 1972; Harsanyi *et al.*, 1974; Bauer und Al-Rubayi, 1987). Als Quelle dauerhafter chronischer Entzündungen wurden nach Implantationsstudien Materialpartikel diskutiert, die gelegentlich bei der Oberflächenbearbeitung von Kompositrestaurationen entstehen und die in die Gingiva eingelagert werden könnten (Moore und Barker, 1986; Hansasuta *et al.*, 1993).

2.2.2 Pulpastudien mit Kompositen

Die Pulpareaktionen in menschlichen und tierischen Zähnen nach Applikation von Kompositfüllungswerkstoffen umfaßten je nach Vorbehandlung des Dentins das breite Spektrum von keinen oder nur leichten bis zu schweren Gewebeschäden (Geurtsen, 1988). Dies lag an den verschiedenen Materialien selbst, der Säurewirkung nach dem Ätzen des präparierten Dentins oder einer vergleichbaren Vorbehandlung vor dem Einbringen des Komposites und der Verwendung von Dentinklebern zur Befestigung des Füllungskunststoffes. Die Ausbildung eines Randspaltes zwischen Dentin und Kompositfüllung als Folge der Polymerisationsschrumpfung des Werkstoffes und die Invasion von Bakterien in diesen Spalt hinein kann sekundär zu Pulpaentzündungen führen (Swift, 1989). Die Ergebnisse, die im folgenden anhand ausgewählter Beispiele stellvertretend für viele andere vergleichbare Untersuchungen knapp vorgestellt werden, wurden überwiegend in Klasse V-Kavitäten an Zähnen von Affen erzielt.

Ähnlich wie in Implantationsexperimenten wurde auch in Pulpastudien beobachtet, daß die gewebeschädigenden Effekte der Werkstoffe mit längeren Liegezeiten abnahmen. Bereits nach 24 Stunden Liegezeit waren mehr toxische Komponenten chemisch gebunden als nach sehr kurzen Liegezeiten (Spangberg *et al.*, 1973; Heys *et al.*, 1977; Mjör *et al.*, 1977; Heys *et al.*, 1985; Hörsted-Bindslev *et al.*, 1986). Mittlere bis starke Pulpareaktionen wurden jedoch gelegentlich auch nach einer Liegezeit von zwei Monaten beobachtet (Dalleske *et al.*, 1978). Starke Pulpareaktionen schienen vor allem von den ersten UV- und lichthärtenden Kompositen ausgelöst zu werden (Stanley *et al.*, 1975; Myers *et al.*, 1976; Bloch *et al.*, 1977). Ein UV-härtendes Komposit verursachte im Unterschied zu einem selbsthärtenden Komposit noch nach sechzig Tagen schwere Pulpaschäden (Stanley *et al.*, 1972).

Komposite schienen in Kavitäten, die mit demineralisierenden Substanzen geätzt wurden, schwere Entzündungen des Pulpagewebes zu verursachen (Eriksen und Leidal, 1979). Wurde nach der Applikation von Säure auf die ungeschützte Pulpa mit einem Komposit verschlossen, lag selbst nach drei Monaten Liegezeit des Füllungswerkstoffes eine Pulpaschädigung vor (Schmalz, 1985). Eine Säureätzung des Dentins vor dem Einbringen des Füllungsmaterials verstärkte den toxischen Effekt des Füllungsmaterials. Offensichtlich können toxische Komponenten dann schneller durch Dentin diffundieren (Pashley, 1994). Nach vergleichbaren Liegezeiten wurden jedoch für andere Komposite lediglich schwache Pulpareaktionen gefunden, die zeitabhängig abgeklungen waren (Wennberg *et al.*, 1983). Allerdings wurden gelegentlich selbst nach Säureätzung des Dentins nur schwache Reaktionen des Pulpagewebes beschrieben (Inokoshi *et al.*, 1982).

Nicht immer lösen Komposite in tiefen Kavitäten selbst ohne die Verwendung einer pulpaschützenden Unterfüllung toxische Reaktionen des Pulpagewebes aus. Über nur leichte Entzündungsreaktionen der Pulpa nach Applikation von Kompositen auch in tiefen Kavitäten ohne die Verwendung von Unterfüllungen wurde verschiedentlich berichtet (Rao, 1971; Auvenshine und Eames, 1972; Heys *et al.*, 1977). Fast keine Entzündung der Pulpa oder eine Schädigung des Odontoblastensaums wurde beobachtet, wenn die Invasion von Bakterien in den Kavitätenboden und die Dentintubuli ausgeschlossen werden konnte (Fuks *et al.*, 1990).

Schwere Schäden der ungeschützten Pulpa hingegen traten häufig auf, wenn die verbleibende Dentinstärke zwischen Pulpa und Füllungsmaterial weniger als 1 mm betrug. Unterfüllungsmaterialien zwischen dem Komposit und der Pulpa übernahmen hier eine schützende Funktion. Kalziumhydroxid verhinderte schwere Pulpaschäden durch Komposite in tiefen Kavitäten (Myers *et al.*, 1976; Leidal und Eriksen, 1985; Schmalz, 1985; Cox *et al.*, 1987).

Der Einfluß der Größe der Füllerpartikel eines Komposites auf die Gewebeverträglichkeit wurde unterschiedlich beurteilt. Es ist hier zu beachten, daß mikro- und makrogefüllte Komposite auch auf einer verschiedenen Kunststoffmatrix aufbauen. Mikrogefüllte Systeme führten zu geringeren Pulpaveränderungen als makrogefüllte (Triadan, 1982; Schmalz, 1985). Andererseits wurde kein Unterschied in der Wirkung zweier mikrogefüllter Komposite auf das Pulpagewebe verglichen mit einem herkömmlichen Komposit mit feinen Füllstoffen festgestellt. Nach anfänglicher leichter bis mäßiger Pulpareaktion nach drei und fünf Tagen wurden nach längerer Exposition von acht Wochen nur noch geringe oder gar keine Reaktionen gefunden (Heys *et al.*, 1985).

Eine Reihe verschiedener Kompositmonomere wurde direkt im Dentin-Pulpa-Test an Affen geprüft. Überraschenderweise waren neben anderen Kompositmonomeren das Basis-monomer Bis-GMA und der Verdünner Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) sogar nach Applikation in Kavitäten mit einer verbleibenden Dentinschicht von weniger als 1 mm auch nach drei Wochen Exposition nicht toxisch (Stanley *et al.*, 1979).

Wird die Biokompatibilität eines zahnärztlichen Füllungsmaterials *in vivo* geprüft, ist neben den beschriebenen Materialeffekten selbst und den Bedingungen der Verarbeitung, der Einfluß kontaminierender Bakterien der Mundhöhle zu berücksichtigen. Weil das Volumen von Kompositfüllungsmaterialien als Folge der Polymerisationsreaktion schrumpft, kann zwischen dem Werkstoff und der Kavitätenwand ein Spalt von bis zu 20 µm entstehen (Bergvall und Brännström, 1971). In diesem Raum können Bakterien aus der Mundhöhle siedeln. Bakterien wurden unter Amalgamfüllungen, einem Silikatzement und unter Kompositfüllungen nachgewiesen. Lediglich Zinkoxid-Eugenol verhinderte das Wachstum von Bakterien (Bergenholtz *et al.*, 1982). Entzündungen der Pulpa und die Anwesenheit von Bakterien auf dem Kavitätenboden und in Dentintubuli unter den Füllungsmaterialien wurden miteinander ursächlich

in Verbindung gebracht (Brännström und Nyborg, 1971; Brännström und Vojinovic, 1976; Qvist, 1975; Hörsted *et al.*, 1986; Hörsted-Bindslev, 1987). Es wurde berichtet, daß Extrakte oder Komponenten kultivierbarer Bakterien der Plaque menschlicher Zähne innerhalb weniger Stunden Entzündungen der Pulpa verursachten, wurden sie im Tierversuch in Kavitäten eingebracht (Bergenholtz und Lindhe, 1975; Bergenholtz und Warfvinge, 1982).

Leichte bis mittlere Entzündungsreaktionen der Pulpa und geringe Schäden des Odontoblastensaums nach Applikation lichthärtender oder chemisch härtender zahnärztlicher Komposite wurden beobachtet, wenn nach kurzer Liegezeit des Materials keine bakterielle Kontamination festgestellt wurde. Schwere Entzündungsreaktionen nach kurzer (acht Tage) und nach langer Liegezeit (90 Tage) unter Kavitäten ohne Unterfüllung traten fast immer in Verbindung mit bakterieller Kontamination auf (Hörsted *et al.*, 1986). Weil sich nach wenigen Wochen üblicherweise Bakterien unter den Füllungen ansiedelten, nahm man an, daß Reaktionen der Pulpa nach langen Liegezeiten eines Komposites in erster Linie durch die Aktivität von Bakterien verursacht wurden (Brännström, 1984; Browne und Tobias, 1986; Bergenholtz, 1990).

2.2.3 Klinische Untersuchungen

Die biologische Verträglichkeit zahnärztlicher Komposite wurde bisher in klinischen Studien nur spärlich untersucht. Meist wurde auf der Basis von Sensitivitätstests (Vitalitätsprüfung und Schmerzsymptomatik) auf die biologische Verträglichkeit der Komposite geschlossen (Bayne, 1992). Pulpen menschlicher Zähne, die aus kieferorthopädischen Gründen extrahiert werden sollten, reagierten nach Applikation von Kompositen mit leichten Entzündungen. In Verbindung mit einer Unterfüllung waren die Materialien gut verträglich (Dalleske *et al.*, 1978; Leidal und Eriksen, 1985; Geurtsen, 1988).

Veränderungen des gesunden Zahnfleisches, etwa leichtere Entzündungen der Gingiva, bis hin zu Parodontalerkrankungen sind wahrscheinlich nur in seltenen Fällen auf die chemische Toxizität von Kompositen zurückzuführen; meistens wurden sie durch erhöhte bakterielle Plaqueablagerung auf Kompositen mit subgingivalen Rändern bewirkt (Schmalz, 1985; Moore und Baker, 1986). Die Oberfläche konventioneller Komposite oder Hybridkomposite war nach dem Polieren glatt (Roulet und Roulet-Mehrens, 1981; van Dijken *et al.*, 1992). Allerdings veränderte sich diese Oberfläche bereits nach sehr kurzer Zeit (van Dijken *et al.*, 1980; van Dijken *et al.*, 1983; van Noort und Davis, 1984). Bakterielle Plaque konnte dann die Oberflächen vor allem der konventionellen Kompositrestauration besiedeln (Skjörland, 1973; Skjörland und Sonju, 1982; Dummer und Harrison, 1982). Mikrofeingefüllte Komposite mit einer sehr glatten Oberfläche unmittelbar nach der Verarbeitung sammelten nicht mehr bakterielle Plaque als die Schmelzoberfläche des Zahnes selbst. Mit zunehmendem Alter der Kompositrestauration fand man allerdings unabhängig vom verwendeten Komposittyp eine erhöhte Plaqueablagerung und in Zusammenhang damit einen höheren Entzündungsgrad der Gingiva (van Dijken *et al.*, 1987a; van Dijken *et al.*, 1987b).

2.2.4 Allergische Reaktionen nach Kontakt mit Kompositmonomeren

Klinische Manifestationen unerwünschter Reaktionen in Patienten nach Kontakt mit verschiedenen zahnärztlichen Materialien wurden mit Häufigkeiten von 1/700 bis 1/1000 (Personen), in einer neueren Untersuchung in den USA mit 1/800 bis 1/8000 (Ereignisse/Jahr) angegeben (Hensten-Pettersen und Jacobson, 1991; Kallus und Mjör, 1991; Stanley, 1992; Barry *et al.*, 1996). Zahnärztliches Personal war besonders betroffen, weil es in weit größerem Maße als Patienten über eine lange Zeit vergleichsweise großen Mengen eines Materials exponiert ist, das vor und während der Verarbeitung noch nicht in einen vollkommen unlöslichen Zustand gebracht wurde (Munksgaard, 1992a; Stanley, 1992).

Allergische Reaktionen nach Kontakt mit zahnärztlichen Materialien sind die häufigsten Nebenwirkungen (Hensten-Pettersen, 1984; Munksgaard *et al.*, 1990; Munksgaard, 1992a). Es wurden auch allergische Reaktionen der Mundschleimhaut nach Kontakt mit Bis-GMA-haltigen Füllungsmaterialien beobachtet (Alanko *et al.*, 1996). Zahntechniker sind besonders häufig und über lange Zeit zahnärztlichen Kompositen exponiert und leiden deshalb oft an allergischen Hautreaktionen (Kanerva *et al.*, 1994; Mürer *et al.*, 1995a; Mürer *et al.*, 1995b; Rustemeyer und Frosch, 1996). Etwa 2% der dänischen Zahnärzte berichteten über Kontaktallergien, die auf den Umgang mit Dimethacrylaten zurückzuführen seien (Munksgaard *et al.*, 1996). Verglichen damit war eine allergische Kontaktsensibilisierung bei Patienten selten, selbst wenn eine einzige zufällige Exposition eine Sensibilisierung auslösen kann (Agner und Menne, 1994; Kanerva *et al.*, 1994). Verschiedene Kompositmonomere sind Kandidaten für die Auslösung allergischer Reaktionen. Allergenes Potential ist für MMA, HEMA, TEGDMA, Bis-GMA, UDMA und andere Urethanmethacrylate beschrieben worden (Bradford, 1948; Nathanson und Lockhart, 1979; Estlander *et al.*, 1984; Kanerva *et al.*, 1986; Kanerva *et al.*, 1989; Munksgaard *et al.*, 1990). Für Bis-GMA und TEGDMA ist das allergene Potential im Tierversuch nachgewiesen (Rathinam und Mohanan, 1993; Söhoel *et al.*, 1994). Auch Bisphenol A löste im Tiermodell eine photoallergische Kontaktdermatitis aus (Maguire, 1988). Formaldehyd, das nach Oxidation von Doppelbindungen in Dimethacrylaten an der Oberfläche von Kompositen entsteht, wird freigesetzt und kann allergene Reaktionen induzieren. Es entsteht auch über offenen Behältern, die MMA enthalten (Hensten-Pettersen, 1984; Kallus, 1984; Brune und Beltesbrekke, 1981; Oysaed *et al.*, 1988). Auch freie Methylmethacrylat-Monomere in autopolymerisierendem Prothesenmaterial können allergene Reaktionen auslösen (Baker *et al.*, 1988).

In der überwiegenden Mehrzahl manifestierten sich Kontaktallergien aufgrund des häufigen Hantierens mit Kompositmaterialien an den ersten drei Fingern der exponierten Hand (Kanerva *et al.*, 1993). Das Tragen von Handschuhen auf Vinyl- oder Latexbasis oder ähnlichen Materialien in der zahnärztlichen Routine bedeutet nur bedingten Schutz (Mürer *et al.*, 1995a).

Verschiedene Kompositmonomere diffundieren innerhalb weniger Minuten durch diese Handschuhe (Munksgaard, 1992b).

3 Biologische Verträglichkeit von Kompositen und Kompositmonomeren *in vitro*

Kompositfüllungsmaterialien führten im Dentin-Pulpa-Test *in vivo* in tiefen Kavitäten bei geringer Restdentinstärke in manchen Fällen zu massiven Schädigungen der Pulpa, sofern keine schützende Unterfüllung verwendet wurde. Auch das einer Kompositfüllung anliegende Gingivagewebe kann mitunter geschädigt werden. Obwohl diese Effekte überwiegend auf die Wirkung der bakteriellen Plaque auf der Oberfläche der Komposite zurückgeführt wurden, können die Komposite selbst toxisch auf Gewebe der Mundhöhle wirken. Dies schloß man vor allem aus Implantationsversuchen, in denen das Gewebe nach kurzen Liegezeiten oft stark entzündet war.

Man darf aufgrund der unvollständigen Monomer-Polymer-Konversion der Komposite, der *in vitro* gemessenen Konzentrationen ausgelaugter Kompositmonomere und der Beobachtungen zur Toxizität von Kompositen *in vivo* annehmen, daß unmittelbar nach der Polymerisation des Materials toxische Komponenten aus Kompositfüllungen freigesetzt werden. Sie könnten über das Dentin das darunterliegende Pulpagewebe erreichen und dort wirksam werden. Toxische Kompositmonomere könnten jedoch auch im Speichel gelöst werden und die Gingiva und andere Gewebe der Mundhöhle oder die Haut nachteilig beeinträchtigen.

Toxische Konzentrationen der Kompositmonomere können *in vitro* bestimmt werden. War das Interesse in den Anfängen der *in vitro* Untersuchungen der biologischen Aktivität dentaler Werkstoffe, Komposite inbegriffen, darauf gerichtet, die Tauglichkeit dieser Methoden als kostengünstige Alternativen zu den aufwendigen und teuren Tierversuchen zu etablieren, versucht man heute auch verstärkt die Mechanismen der toxischen Wirkung von Kompositen

und ihrer Komponenten, aber auch anderer zahnärztlicher Werkstoffe, durch die Anwendung von *in vitro*-Methoden aufzuklären.

Den Beobachtungen nach Implantationsversuchen *in vivo* vergleichbar, erwiesen sich zahnärztliche Komposite in Zellkulturversuchen in der Regel als toxisch. Der Grad ihrer Toxizität war aufgrund variabler Versuchsbedingungen durchaus sehr verschieden (Wennberg *et al.*, 1983; Geurtsen, 1987). Testergebnisse variierten mitunter mit der Testmethode. Auch andere variable experimentelle Parameter führten zu unterschiedlichen Toxizitätsdaten *in vitro*. So können die verwendeten Zelllinien, die Zellkulturmedien samt Serumgehalt, Liegezeiten der Werkstoffe nach der Monomer-Polymer-Konversion, das Extraktionsmedium für Prüfkörper und die Dauer der Extraktion oder das Verhältnis der Oberfläche der Prüfkörper zum Volumen des Extraktionsmediums unterschiedliche biologische Reaktionen erzeugen. Das Einbringen von Dentin als physiologische Barriere zwischen Material und Zielzellen war für die Prüfung von Füllungsmaterialien *in vitro* ein erster Schritt, wenige experimentelle Parameter zu kontrollieren (Hensten-Pettersen 1988; Schmalz, 1981; Schmalz und Schweikl, 1994).

3.1 Prüfmethoden zur Bestimmung der Zytotoxizität zahnärztlicher Komposite

Verschiedene Testmethoden wurden zur Prüfung der Biokompatibilität zahnärztlicher Materialien immer wieder verwendet, um ihre Sensitivität zu beurteilen und abzuschätzen, inwiefern die erzielten Ergebnisse auf bekannte Befunde *in vivo* Befunde zu beziehen waren. So waren nach Applikation eines Komposites das Zellwachstum und die Fähigkeit der Zellen zur Koloniebildung geringfügig eingeschränkt, die Zytotoxizität im Agardiffusionstest war moderat und die ⁵¹Cr-Freisetzung aus behandelten Zellen ließ sogar auf keine Zytotoxizität des Materials schließen. Die vergleichsweise geringe Zytotoxizität eines Silikatzements und die sehr starke Toxizität des Zinkoxid-Eugenols, die als Referenzmaterialien dienten, standen aber diametral im Gegensatz

zu den klinischen Befunden (Hensten-Pettersen und Helgeland, 1977). Die geringe Giftigkeit des Komposites in diesem Testansatz stimmte nicht mit früheren Erfahrungen überein, die für Komposite eine hohe Toxizität *in vitro* ergaben (Helgeland und Leiskar, 1972; Tronstad und Spangberg, 1974). Allerdings waren diese Unterschiede wohl hauptsächlich auf die unterschiedlichen Relationen von Mediumvolumen zur Oberfläche der Prüfkörper zurückzuführen, nicht auf die Testmethode selbst (Hensten-Pettersen und Helgeland, 1977; Mjör *et al.*, 1977). Große Oberflächen der Prüfkörper pro Volumeneinheit führten zu stärkeren toxischen Reaktionen. Variationen des Verhältnisses von Medium-volumen zur Größe der Prüfkörper ließen die Komposite *in vitro* entweder als extrem giftig oder aber als ungiftig erscheinen (Hensten-Pettersen und Helgeland, 1977; Meryon, 1988; Browne, 1985). Ähnliche Variationen zytotoxischer Effekte wurden für chemisch härtende Komposite und ein lichthärtendes Komposit im Vergleich mit Zinkoxid-Eugenol (ZOE) und Silikatzement in verschiedenen Testsystemen beobachtet. Im Agardiffusionstest und im Filtertest waren die chemisch härtenden und lichthärtenden Komposite nach kurzen Liegezeiten von einer Stunde und 24 Stunden schwach bis mäßig toxisch. Diese Prüfmethoden führten zu sehr ähnlichen Resultaten, obwohl die zwischen den Zellen und den Prüfmaterialien eingebrachten Barrieren, Agar im Agardiffusionstest und ein Nitrozellulosefilter im Filtertest, unterschiedlich dick und chemisch verschieden waren. Die etwas geringere Toxizität im Filtertest beruhte wohl auf der kürzeren Expositionszeit von nur 2 Stunden. Dieselben Komposite waren auch im ^{51}Cr -Freisetzungstest, der ohne Barriere zwischen Material und Zellen auskommt, überwiegend mäßig toxisch. Die Toxizität der Komposite war in sämtlichen Testsystemen sehr viel schwächer als die Wirkung des ZOE (Wennberg *et al.*, 1983).

Der Nachweis toxischer Effekte zahnärztlicher Materialien über die Aktivitäten verschiedener Enzymsysteme ergab keine meßbaren Unterschiede in der Sensitivität der Methoden. Der Kompositwerkstoff war verglichen mit anderen das ungiftigste Material, Zinkoxid-Eugenol (ZOE)

hingegen war stark toxisch (Meryon und Riches, 1982). Testsysteme mit anderen biologischen Endpunkten als Indikatoren der Zellvitalität reagierten sensitiv und selektiv auf Materialien verschiedener chemischer Zusammensetzung. So war ein quantitativer Neutralrot-Test, der auf funktionalen Membranen saurer intrazellulärer Vesikel beruht, sensitiver als der MTT-Test, der die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen mißt (Schweikl und Schmalz, 1996b). Wichtig war in diesem Zusammenhang auch die Beobachtung, daß ein ungefülltes Basissystem eines Komposites mit TC50-Konzentrationen die RNA- und Proteinsynthese, nicht jedoch die DNA-Synthese in Mauslymphomzellen reversibel inhibierte. Das ungefüllte Katalysatorsystem hingegen hemmte alle drei Synthesewege irreversibel (Geurtsen, 1988). Auch wenn diese Analysen nicht weiter betrieben wurden, bleibt festzuhalten, daß die unterschiedliche Zusammensetzung der beiden Komponenten anscheinend selektiv auf die natürliche Synthese von Makromolekülen einwirkte.

3.2 Primäre Zellen und Zellen permanenter Zelllinien

Die Frage, ob primäre Zellen oder Zellen permanenter Zelllinien sich für die Untersuchung der Zytotoxizität dentaler Materialien besser eignen, wurde von vielen Arbeitsgruppen wiederholt bearbeitet. Man weiß heute, daß verschiedene Zelltypen unterschiedlich sensitiv auf verschiedene zahnärztliche Materialien reagierten (Geurtsen, 1988; Hensten-Pettersen und Helgeland, 1981; Meryon *et al.*, 1985). So beeinträchtigten Eluate eines Komposites, aber auch eines Zinkphosphatzements, die Vitalität primärer humaner Gingivazellen in quantitativen Zytotoxizitätstests weit weniger als die Vitalität transformierter Mausfibroblasten. Die Rangfolge der induzierten zytotoxischen Effekte war in beiden Zellkulturen gleich (Hanks *et al.*, 1981; Schmalz und Schweikl, 1990; Schweikl und Schmalz, 1996b). Vergleichbar damit lagen die TC50-Werte für Komposite und Kompositmonomere in Epithelzellen und Fibroblasten aus der

menschlichen Gingiva etwa um den Faktor zwei über denjenigen in Mauslymphomzellen (Geurtsen, 1988).

Andererseits zeigten verschiedene primäre humane Zelllinien der Gingiva und transformierte Mausfibroblasten (L929-Zellen) im semiquantitativen Agardiffusionstest nahezu identische zytotoxische Reaktionen (Schmalz und Sharaf, 1988). Mitunter schien also die Sensitivität verschiedener Zelltypen mit den verwendeten Nachweismethoden für zytotoxische Effekte zu variieren. Humane Epithelzellen, Gingivafibroblasten oder epitheliale Zellen der Gingiva, die im selben Medium kultiviert wurden, reagierten abhängig vom verwendeten Testsystem auf drei verschiedene Kompositmaterialien in unterschiedlichem Maße mit reduzierter Zellvitalität. Hier war auch die Rangfolge der Zytotoxizität der Komposite in den Zellen verschiedenen Ursprungs unterschiedlich (Hensten-Pettersen und Helgeland, 1981).

Ein interessanter Aspekt bei der Verwendung primärer humaner Zellen ist die Frage, bis zu welcher Passage diese Zellen reproduzierbare Ergebnisse liefern. Die zytotoxischen Effekte des Champherquinons, eines Photoinitiators in Kompositwerkstoffen, lieferten deutliche Hinweise, daß primäre Zellen der humanen Gingiva über die zehnte Passage hinaus nicht mehr für Zytotoxizitätsprüfungen verwendet werden sollten. In höheren Passagen mit sehr langen Generationszeiten von etwa 70 Stunden sind wohl geringe zytotoxische Effekte mit den heute üblichen Nachweismethoden nicht meßbar (Lehmann *et al.*, 1996). Die Diskussion um die Frage der Zellart, die für die Prüfung der Zytotoxizität auch von Kompositen *in vitro* zu verwenden ist, wird wohl erst dann auf eine neue Stufe gehoben, sobald aus einer Kultur primärer Pulpa- oder Gingivazellen oder anderer potentieller Zielzellen des Mundraumes eine permanente Zelllinie etabliert ist. Die Charakterisierung immortalisierter Zellen aus dem Zahnkeim der Maus oder transformierter humaner Pulpazellen ist ein Anfang in dieser

Forschungsrichtung (Hanks *et al.*, 1996; Panagakos, 1996; Fang *et al.*, 1996; Thonemann *et al.*, 1997).

3.3 Liegezeit angemischter Komposite und Serumgehalt der Kulturmedien

Die Zytotoxizität von Kompositen ist abhängig von der Liegezeit nach der Monomer-Polymer-Konversion. Frisch angemischte Komposite waren in direktem Kontakt mit den Prü fzellen sehr giftig, die zytotoxische Wirkung ließ allerdings bereits nach 24 Stunden Liegezeit deutlich nach (Spangberg *et al.*, 1973). Die relative Luftfeuchtigkeit während der Lagerung der Prüfkörper nach Initialisierung der Polymerisationsreaktion schien allerdings im Unterschied zu Zementen die Zytotoxizität von Kompositen nicht zu beeinflussen (Wennberg *et al.*, 1983; Schmalz *et al.*, 1989; Schmalz und Schweikl, 1990; Bruce *et al.*, 1993; Schweikl und Schmalz, 1996b). Jedoch resultierten längere Bestrahlungszeiten zum Starten der Monomer-Polymer-Konversion lichthärtender Komposite in höheren Polymerisationsraten und folglich in geringerer Zytotoxizität eines Komposites (Caughman *et al.*, 1991; Lefebvre *et al.*, 1994; Lefebvre und Schuster, 1994)

Ein hoher Serumgehalt im Kulturmedium experimenteller Zellkulturen führte zu geringer Zytotoxizität einiger zahnärztlicher Werkstoffe. Die ohnehin geringe Zytotoxizität eines zahnärztlichen Komposites im Vergleich zu verschiedenen Zementen wurde allerdings im Unterschied zu diesen Werkstoffen durch höhere Serumkonzentrationen nicht reduziert. Es kam demnach wohl zu keiner Interaktion zwischen Kompositmonomeren und Serumproteinen, die die wirksamen Konzentrationen dieser Komponenten herabsetzten (Imai *et al.*, 1982). Eine ausführliche Übersicht über diesen Aspekt der biologischen Materialprüfung dentaler Werkstoffe *in vitro* ist an anderer Stelle erschienen (Hensten-Pettersen, 1988).

3.4 Dentin-Barriere-Tests

Dentin durfte als Barriere zwischen Füllungsmaterial und Zielzellen der *in vitro*-Testmethoden nicht fehlen, die als Alternativen zu Tierversuchen (Pulpa-Dentin-Anwendungsprüfung) etabliert werden sollten. Es wurden in den letzten Jahren verschiedene Versuchsansätze entwickelt, Dentin in Zellkultursysteme zu integrieren und damit die Simulation klinischer Verhältnisse bei Zytotoxizitätsprüfungen zu verbessern. Die Standardisierbarkeit des Versuchsaufbaues war eine wesentliche Voraussetzung, einen solchen Versuchsansatz in eine Norm für die Prüfung von Füllungsmaterialien aufnehmen zu können (Browne, 1985; Meryon, 1988; Schmalz, 1995). In einem ersten Ansatz wurden menschliche Zähne zu Dentinpulver gemahlen, das danach zu etwa 0,5 mm dicken Dentscheiben gepreßt und so zwischen Material und Zielzellen eingebracht wurde. Man erwartete Ergebnisse, die besser reproduzierbar waren und Versuchsbedingungen, die besser standardisierbar erschienen verglichen mit der Verwendung von Zahnscheiben, die aus verschiedenen Individuen stammten (Tyas, 1977). Ein Komposit war in diesem Versuchsansatz nicht toxisch (Meryon, 1988). Dieser experimentelle Weg schien erfolgversprechend, wurden Materialien geprüft, die mit der Dentinsubstanz chemisch reagieren konnten. Ein großer Nachteil dieser Strategie war allerdings, daß die Permeabilitätseigenschaften der Scheiben aus gepreßtem Dentinpulver aufgrund der fehlenden Dentintubuli anders waren als die des natürlichen Dentins. Die Permeabilitätseigenschaften schienen für die Toxizität der Komposite eine größere Rolle zu spielen als die chemische Wechselwirkung der Testmaterialien mit der Dentinsubstanz (Hanks *et al.*, 1994).

Unterstützt wurde diese Interpretation durch die Ergebnisse aus Versuchen mit einem anderen System, bei dem Kronen menschlicher Zähne verwendet wurden (Hume, 1985). Die zwischen Testmaterial und Zellkulturmedium verbliebene Dentinecke entsprach in etwa der auch *in vivo* unter mittleren bis tiefen Kavitäten vorhandenen Dentinstärke. Ein Kompositfüllungsmaterial

war in Kavitäten mit nicht-angeätztem Dentin nach einer Liegezeit von mehr als drei Tagen nur schwach toxisch; in Kavitäten mit geätztem Dentin setzte die toxische Wirkung bereits in den ersten Stunden nach der Applikation mit in etwa derselben Intensität ein. Eine Schmierschicht aus gemahlenen Dentinkomponenten, die beim Schneiden des Dentins entstand, bremste also die Permeabilitätsgeschwindigkeit toxischer Komponenten aus dem Komposit durch das Dentin hindurch.

Die Dentindicke zwischen Füllungsmaterial und Zielzellen ist ein Parameter, der die toxische Reaktion von Zellen modifizieren kann. Je stärker die verbleibende Dentinschicht ist, desto geringer ist die Konzentration einer toxischen Komponente an den Zielzellen. Daß Dentin auch eine physiologische Diffusionsbarriere *in vitro* ist, wurde für Komposite in einem *in vitro dentin barrier test* gezeigt. Die moderate Zytotoxizität lichthärtender und chemisch aushärtender Komposite in Versuchsansätzen ohne Dentin wurde durch eine Dentinscheibe zwischen den Zellen und den Testmaterialien nahezu vollständig eliminiert. Die Schutzfunktion der Dentinscheibe nahm mit steigender Dicke (0,5 mm und 1,5 mm) zu (Hanks *et al.*, 1988). Mit diesem experimentellen Ansatz verbesserte sich also die Korrelation von *in vitro*- "Screening"-Tests und Anwendungstests unter Bedingungen, die es wasserlöslichen Substanzen erlaubten, aus den Kompositen oder anderen zahnärztlichen Materialien herauszudiffundieren und in klinisch relevanten Mengen die Zielzellen zu erreichen.

Es wurden aufgrund dieser Untersuchungen viele Parameter bekannt, die die Wirkung zahnärztlicher Werkstoffe einschließlich der Kompositfüllungsmaterialien auf die Zellen *in vitro* modifizieren könnten. Es galt nun, variable Versuchsparameter festzulegen und ihre Wahl für das jeweilige Prüfverfahren zu begründen. Dies ist der wesentliche Inhalt der heutigen nationalen und internationalen Normen der biologischen Prüfung dentaler Materialien (Schmalz, 1995). Diese Normen sollen helfen, eine Rangfolge der Zytotoxizität der Prüfmaterialien im

Vergleich mit geeigneten Referenzmaterialien zu ermitteln (*ranking*) und so Ergebnisse vergleichbar zu machen, die von verschiedenen Personen in verschiedenen Laboratorien erzielt wurden. Diskrepanzen zwischen *in vitro* und *in vivo* Resultaten, wie beispielhaft für das Zinkoxid-Eugenol in vielen der bisher angeführten Literaturdaten wiederholt festgestellt, werden allerdings auch damit nicht aufgehoben.

Seit der Einführung von Zellkulturmethoden zur Prüfung der biologischen Verträglichkeit zahnärztlicher Werkstoffe wurden keine guten Korrelationen zwischen den Ergebnissen aus *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen erzielt (Wennberg *et al.*, 1983; Mjör *et al.*, 1977; Hensten-Pettersen und Helgeland, 1977; Schmalz 1982). Eine große Studie mit einer einzigen Gruppe von Materialien, die in verschiedenen Laboratorien von verschiedenen Personen mit unterschiedlichen Methoden *in vitro* und *in vivo* getestet werden, um die Güte dieser Korrelationen statistisch besser abzusichern, wäre demnach wünschenswert. Für die Prüfung von Wurzelkanalfüllungsmaterialien wird gegenwärtig ein solches Projekt durchgeführt (Watts und Paterson, 1993).

Heute rücken neben der Möglichkeit, ein *ranking* der Zytotoxizität dentaler Werkstoffe zu ermitteln, vermehrt andere Vorzüge der *in vitro* Methoden in den Mittelpunkt des Interesses. Isoliert vom Gesamtorganismus kann man *in vitro* die vergleichsweise wenigen experimentellen Bedingungen kontrollieren und über deren gezielte Variation Mechanismen der toxischen Wirkung dentaler Werkstoffe aufklären. Die Qualität biologisch aktiver Komponenten zahnärztlicher Werkstoffe kann ermittelt und deren wirksame Konzentrationen können quantifiziert werden. Erst wenn zytotoxische Konzentrationen wichtiger Komposit-monomere (vgl. Kapitel IV) bekannt sind, können biologische Effekte im subtoxischen Konzentrationsbereich analysieren und erklären werden.

4 Effekte subtoxischer Konzentrationen der Kompositmonomere

4.1 Östrogene Effekte

Östrogene Wirkungen wurden für natürliche und chemisch synthetisierte Substanzen, die auch für Menschen möglicherweise gesundheitsschädlich sind, mehrfach beschrieben. Umweltchemikalien mit östrogener Wirkung (Xeno-Östrogene) wirken wie Hormone und könnten zu verringerter Fruchtbarkeit und Anomalien oder Fehlfunktionen der Geschlechtsorgane führen (McLachlan, 1980; McLachlan, 1993; Finch *et al.*, 1984; Henderson *et al.*, 1988; Brotons *et al.*, 1995; Guilette, 1995). Die Wirkung dieser Substanzen, beispielsweise der polychlorinierten Kohlenwasserstoffe oder des Octylphenols, basiert auf ihrer Konkurrenz mit dem natürlichen Östrogen um die Bindungsstelle am Östrogenrezeptor (Bitman und Cecil 1970; Arnold *et al.*, 1996a; Gray *et al.*, 1996).

Das Bisphenol A (BPA), das häufig als Monomer in der Produktion von Plastikartikeln auf Polykarbonatbasis und verwandter Produkte verwendet wird und das Bestandteil eines häufig verwendeten Basismonomers (Bis-GMA) zahnärztlicher Komposite ist, ist ein Xeno-Östrogen (Viohl *et al.*, 1986; Feldman und Krishnan, 1995). Östrogene Effekte wurden vor kurzem für Extrakte eines Komposites (Fissurenversiegler) beschrieben. Die Wirkung wurde den Komponenten Bisphenol A und Bisphenol A-dimethacrylat zugeschrieben. Die Konzentrationen der beiden Substanzen, die die Proliferation östrogenabhängiger Zellen (MCV-7) ähnlich wie das natürliche Substrat Östrogen um den Faktor 5 stimulierten, lagen für das BPA bei 10^{-7} Mol/L und für das Bisphenol A-dimethacrylat bei 10^{-6} Mol/L, und damit weit unter den toxischen Konzentrationen (TC50-Werte). Sie waren jedoch etwa um den Faktor 10^4 - 10^5 höher als die mit gleicher Stärke wirksamen Konzentrationen des Östrogens selbst (Olea *et al.*, 1996).

In einer klinischen Studie wurden Speichelproben von Patienten eine Stunde nach Applikation eines Fissurenversieglers gesammelt. Es wurde berichtet, daß diese Speichelproben teilweise Bisphenol A in Mengen enthielten, die *in vitro* östrogen wirkten. Für Bis-GMA wurde unter pH-neutralen Bedingungen keine östrogene Wirkung gefunden. Erst die Produkte einer saureren (pH 1) oder alkalischen (pH 13) Hydrolyse des Bis-GMA mit einer Konzentration von 10^{-5} Mol/L führten zu zwei- bis dreifach gesteigerten Proliferationsraten der östrogensensitiven MCV-7 Zellen *in vitro* (Olea *et al.*, 1996).

Eine vergleichsweise hohe Dosis von Bis-GMA (0,1 mg/kg Maus) wirkte in ovariectomierten Mäusen schwach östrogen. Die Substanz induzierte im relevanten Zielgewebe (Uterus) eine Gewichtszunahme von etwa 25% verglichen mit ebenfalls ovariectomierten Tieren der Kontrollgruppe. Die Uteri scheinoperierter Tiere oder ovariectomierter Tiere, die mit Östrogen behandelt worden waren, waren um den Faktor 4 bis 9 größer als diejenigen der unbehandelten ovariectomierten Mäuse (Mariotti *et al.*, 1997).

Die Wirkungen von Xeno-Östrogenen auf verschiedene biologische Systeme wurden bisher als gering eingestuft. Die verglichen mit dem natürlichen Substrat geringen Effekte der einzelnen Xeno-Östrogene wurden *in vitro* von Konzentrationen ausgelöst, die offensichtlich, wie für das Bisphenol A und das Bisphenol A-dimethacrylat oben beschrieben, um mindestens das Tausendfache über der effektiven Konzentration des natürlichen Substrates lagen. Nach neuesten Untersuchungen muß diese Ansicht möglicherweise korrigiert werden. Die Kombination zweier schwacher Xeno-Östrogene war *in vitro* tausendfach wirksamer als diejenige der einzelnen Substanzen. Auch für hydroxylierte polychlorinierte Bisphenole wurde eine synergistische Wirkung nachgewiesen (Arnold *et al.*, 1996b). Allerdings gibt es auch *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen, die diese Befunde nicht nachvollziehen konnten und deshalb nachteilige Wirkungen auf den Organismus von Tier und Mensch ausschlossen (Ashby *et al.*, 1997). Ob deshalb aufgrund der vielfältigen Belastung und möglicher synergistischer Effekte bereits geringe Mengen von Xeno-Östrogenen östrogengesteuerte Regulationsmechanismen *in*

vivo ernsthaft modifizieren können und welche Bedeutung dabei Monomeren zukommt, die in zahnärztlichen Kompositen enthalten sind, bleibt in Zukunft zu klären.

4.2 Veränderungen der Genexpression

Bislang gänzlich unbekannte biologische Wirkungen mit noch unbekannter physiologischer Relevanz haben erste Berichte über die Modifizierung der Genexpression in Zellen der Mundhöhle durch Kompositmonomere aufgezeigt. So inhibierten Eluate von Prothesenkunststoffen die Proliferation oraler Epithelzellen und die Synthese der zellulären gesamten RNA (Lewis *et al.*, 1996). Sehr viel spezifischer wurde die Wirkung des Bisphenol A-Glycidylmethacrylats (Bis-GMA) auf die Genexpression in Odontoblasten (*odontoblast-like cells*) der Maus *in vitro* gemessen. So inhibierte Bis-GMA in Konzentrationen, die etwa um den Faktor 10 unter dem TC50-Wert lagen, die Expression der alkalischen Phosphatase über einen Beobachtungszeitraum von drei bis vierzehn Tagen; umgekehrt schien ihre Expression durch noch geringere Bis-GMA-Konzentrationen (Faktor 100) stimuliert zu werden. Auch die Expressionsraten des Osteocalcins wurden durch Bis-GMA modifiziert. Es ist also denkbar, daß die Expressionsraten verschiedener sekretorischer Proteine, die für die Dentinogenese bedeutsam sind, durch Kompositmonomere modifiziert werden könnten. Übertragen auf die klinische Situation könnte dies bedeuten, daß die Bildung der Dentinmatrix ebenfalls beeinflusst wäre (Sun *et al.*, 1996; Hanks *et al.*, 1996; Hanks *et al.*, 1997).

4.3 Modifizierung des Lipidstoffwechsels

Verschiedene Kompositmonomere beeinflussten verschiedene enzymatische Schritte des zellulären Lipidstoffwechsels. Dimethylaminoethylmethacrylat (DMAEMA), ein Aktivator in lichterhärtenden Kompositen, inhibierte die Synthese von Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin. Folglich akkumulierte eine Vorstufe des Phosphatidylethanolamins intrazellulär. Diese Inhibition des Lipidstoffwechsels wurde jedoch mit dem enzymatischen

Abbau des DMAEMA, wahrscheinlich zu Methacrylsäure und Dimethylethanolamin, aufgehoben (Schuster *et al.*, 1996; Schuster *et al.*, 1997). TEGDMA schien den Lipidstoffwechsel nicht zu verändern (Lefebvre *et al.*, 1996). Während der Einfluß von DMAEMA auf die Cholesterinsynthese nicht eindeutig war, steigerten DMAEMA und HEMA die Triglyceridsynthese (Caughman *et al.*, 1996, Lefebvre *et al.*, 1996; Schuster *et al.*, 1996). Die physiologische Bedeutung dieser Effekte ist bislang unbekannt. Über modifizierende Effekte der über Phospholipasen gesteuerten intrazellulären Signaltransduktionsketten oder spezieller Mechanismen, die verändertes Zellwachstum bedingen, kann nach heutiger Kenntnis nur spekuliert werden (Lefebvre *et al.*, 1996; Schuster *et al.*, 1997). Möglicherweise steht die Beobachtung, daß Metabolite von Kompositmonomeren die Proliferation von Makrophagen stimulierten, in diesen Zusammenhang (Tong *et al.*, 1996).

4.4 Modifizierung der Phasen des Zellzyklus

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie wurde die Wirkung toxischer und subtoxischer Konzentrationen des Basismonomers Urethandimethacrylat (UDMA) auf die verschiedenen Phasen des Zellteilungszyklus zweier menschlicher Zelllinien analysiert. Dies war eine der ersten Arbeiten zur Erforschung subzellulärer Mechanismen der Zytotoxizität dentaler Werkstoffe. UDMA-induzierte Störungen des normalen Zellzyklus korrelierten mit geringen Wachstumsraten exponierter Zellen. Eine hohe UDMA-Konzentration (50 µMol/L) verzögerte den Übergang aus der S- in die G₂/M-Phase und blockierte den Zellzyklus in der G₂/M-Phase, so daß nur wenige Zellen wieder in die G₀/G₁-Phase eintraten. Niedrige UDMA-Konzentrationen (10 - 25 µMol/L) hingegen induzierten nur geringe Verschiebungen des Zellzyklus (Nassiri *et al.*, 1994). Der verzögerte oder blockierte Zellzyklus könnte bedeuten, daß hohe UDMA-Konzentrationen DNA-Schäden induzierten, die vor der Zellteilung repariert wurden (Marx, 1994). Es wurden nämlich *in vitro* keine genotoxischen Effekte nachgewiesen. Dieser Punkt wird in Verbindung mit den genotoxischen Effekten des UDMA *in vitro* und *in vivo*, die weiter unten erläutert werden, nochmals diskutiert.

4.5 Mutagenität zahnärztlicher Komposite und Dentinkleber

Untersuchungen zur Mutagenität funktionaler zahnärztlicher Kunststofffüllungsmaterialien in Säugetierzellen liegen in der verfügbaren Literatur nicht vor. Allerdings wurde die Genotoxizität zweier klinisch angewendeter Kompositfüllungsmaterialien in einem bakteriellen Testsystem und in menschlichen Zellen (HeLa) *in vitro* und in einem Invertebratensystem *in vivo* untersucht. Beide Materialien waren in keinem der Testsysteme genotoxisch (Heil *et al.*, 1996). Ein Gemisch verschiedener Epoxide, das in Verbindung mit Spiroorthocarbonat-Verbindungen verwendet werden sollte, war schwach mutagen in *Salmonella typhimurium* TA97 im Ames-Test (Yourtee *et al.*, 1994, Rose *et al.*, 1996).

Die in der vorliegenden Arbeit geprüften Substanzen sind nicht ausschließlich Komponenten zahnärztlicher Füllungsmaterialien. Sie werden auch in Werkstoffen der zahnärztlichen Prothetik und der Kieferorthopädie verwendet und sie sind Bestandteile von Dentinklebern (Van Meerbeek *et al.*, 1992; Hume und Gerzina, 1996; Arima *et al.*, 1996). Für einen Kleber auf Epoxidbasis wurden mutagene und karzinogene Effekte nachgewiesen, allerdings nur nach Extraktion des Materials in einem organischen Lösungsmittel (Athas *et al.*, 1979). Eine neue Formulierung des Materials war in Langzeituntersuchungen *in vivo* nicht karzinogen und *in vitro* im Ames-Test nicht mutagen (Fredericks, 1981; Miller *et al.*, 1984). Wenn auch mit verschiedenen Teststämmen wurde doch übereinstimmend von zwei Arbeitsgruppen für eine Komponente eines anderen Klebesystems Mutagenität im Ames-Test beobachtet (Cross *et al.*, 1983; Li *et al.*, 1990). Der Nachweis mutagener Effekte von Ethanolextrakten lange getragener Prothesen hingegen wurde wahrscheinlich nicht durch extrahierbares Prothesenmaterial selbst verursacht, sondern durch daran adsorbierte Substanzen (Parris *et al.*, 1994).

Einige Dentinkleber und Einzelkomponenten von Dentinklebern, die auch Bis-GMA, TEGDMA oder andere (Di)Methacrylatderivate enthielten, waren im Ames-Test in keinem von fünf verschiedenen *Salmonella typhimurium*-Stämmen mutagen. Auch die Monomere Methyl-

methacrylat (MMA) und 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) waren negativ (Schweikl *et al.*, 1994). Glutaraldehydhaltige Einzelkomponenten verschiedener Dentinkleber hingegen verursachten bevorzugt in *S. typhimurium* TA102 Punktmutationen in AT-reichen DNA-Abschnitten. Die induzierten Mutantenraten stiegen mit dem jeweiligen Gehalt an Glutaraldehyd der verschiedenen Dentinkleber (Li *et al.*, 1990; Schweikl *et al.*, 1994; Schweikl *et al.*, 1996a; Schweikl *et al.*, 1996b).

Dieselben glutaraldehydhaltigen Komponenten der Dentinkleber, die im Ames-Test mutagen waren, waren auch im Genmutationstest mit Säugetierzellen (V79/HPRT-Test) positiv. Im Unterschied zu den Ergebnissen, die mit *S. typhimurium* TA102 im Ames-Test erzielt wurden, waren die induzierten Mutantenraten in V79-Zellen jedoch gering. Wichtig war vor allem, daß die Mutantenraten in V79-Zellen umgekehrt mit dem Gehalt an Glutaraldehyd der Prüfsubstanzen korrelierten. Weil zudem die Mutagenität von Glutaraldehyd in den V79-Zellen nicht eindeutig nachzuweisen war, durfte man vermuten, daß nicht das Glutaraldehyd, wie im Ames-Test, sondern andere Substanzen der Einzelkomponenten in den V79-Zellen mutagen wirken könnten. Bis-GMA und TEGDMA, die neben anderen Kompositmonomeren als Inhaltsstoffe von den Herstellern angegeben wurden, wurden als Kandidaten dafür diskutiert (Schweikl und Schmalz, 1996a; Schweikl und Schmalz, 1997). Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit wichtige Einzelkomponenten der Kompositfüllungsmaterialien im Ames-Test und im V79/HPRT-Test geprüft.

4.6 Genmutationstests: Ames-Test und V79/HPRT-Test

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Mutagenität einiger Kompositmonomere *in vitro* geprüft. Es wurden dazu zwei verschiedene Genmutationstests verwendet. Der Ames-Test (*Salmonella*/Mikrosomen-Test) wurde mit vier verschiedenen *Salmonella typhimurium*-Stämmen, ein Genmutationstest mit Säugetierzellen wurde mit V79-Zellen durchgeführt. Nachfolgend werden zunächst wesentliche Eigenschaften der hier verwendeten

Genmutationstests, weiter unten die mutagenen Effekte der Kompositmonomere in beiden Testsystemen beschrieben.

4.6.1 Der *Salmonella*/Mikrosomen-Test (Ames-Test)

Der *Salmonella*-Mutagenitätstest wurde gegen Ende der 60er Jahre im Laboratorium von B. Ames entwickelt. Es wurden dort viele *Salmonella typhimurium*-Stämme isoliert, die aufgrund verschiedener Mutationen im *his*-Operon die Aminosäure Histidin im Unterschied zum Wildtyp-Stamm *S. typhimurium* LT2 nicht mehr selbst synthetisierten. Auf diesem Stoffwechseldefekt basiert der Rückmutationstest mit *Salmonella typhimurium*. Werden die Bakterien chemischen Substanzen exponiert, können Histidin-auxotrophe Bakterien durch Basenpaarsubstitutionen oder Leserastermutationen zu prototrophen Zellen mutieren. Bakterien und Prüfsubstanz werden mit und ohne Zusatz einer metabolisch aktiven Mikrosomenfraktion (S9-Fraktion) zur Aktivierung der Prüfsubstanz für mindestens 48 h auf Minimalmedium inkubiert. Danach werden die Zahlen induzierter Mutanten (Revertanten) mit den Zahlen der stammtypischen Spontanrevertanten verglichen. Eine Substanz ist im Ames-Test mutagen, wenn sie einen reproduzierbaren dosisabhängigen Anstieg der Revertantenzahlen induziert (DeSerres und Shelby, 1979; Maron und Ames, 1983; Göggelmann, 1993).

4.6.1.1 Besonderheiten verschiedener *Salmonella*-Teststämme

Die *Salmonella typhimurium*-Stämme, die im Ames-Test verwendet werden, tragen unterschiedliche Mutationen im *his*-Operon (Tabelle 3). Die Stämme TA98 (*hisD3052*) und 97a (*hisD6610*) enthalten Leserastermutationen (*frameshift*) in GC-reichen repetitiven DNA-Sequenzen. Durch *in frame*-Insertionen oder Deletionen weniger Basenpaare wird der korrekte Leserahmen wieder hergestellt, die *Salmonella*-Stämme revertieren zur Histidin-Unabhängigkeit (Levin *et al.*, 1982a; Maron und Ames, 1983). *Salmonella tyhimurium* TA100 (*hisG46*) enthält eine *missense*-Mutation ebenfalls in einem GC-reichen DNA-Abschnitt und revertiert nach Basenpaarsubstitution (Transition oder Transversion) zum prototrophen Stamm (Maron und

Ames, 1983). *S. typhimurium* TA102 (*hisG428*) besitzt eine *ochre*-Mutation TAA (*nonsense codon*) auf dem Plasmid pAQ1. Die Rückmutation am AT-Basenpaar kann durch Basenpaarsubstitution oder durch kleinere Deletionen von drei oder sechs Basenpaaren erfolgen (Levin *et al.*, 1982b). Für sämtliche *Salmonella typhimurium*-Stämme liegen detaillierte Angaben zu DNA-Sequenzen am Reversionsort und die Möglichkeiten zur Mutation vor (Hartmann *et al.*, 1986).

Tabelle 3: Genetische Eigenschaften verschiedener *Salmonella typhimurium*-Stämme, die im Ames-Test verwendet werden.

<i>Salmonella</i> -Stamm	Mutationstyp	DNA-Sequenz	Zellwand	DNA-Reparatur	Plasmid
TA97a <i>hisD6610</i>	<i>frameshift</i>	GC	<i>rfa</i>	<i>uvrB</i> ⁻	pKM101
TA98 <i>hisD3052</i>	<i>frameshift</i>	GC	<i>rfa</i>	<i>uvrB</i> ⁻	pKM101
TA100 <i>hisG46</i>	Basenpaarsubstitution	GC	<i>rfa</i>	<i>uvrB</i> ⁻	pKM101
TA102 <i>hisG428</i>	Basenpaarsubstitution, Insertion, Deletion	AT	<i>rfa</i>	<i>uvrB</i> ⁺	pKM101 pAQ1

Über die stammspezifischen Mutationen hinaus erhöhen andere genetische Veränderungen im Unterschied zum Wildtyp-Stamm *S. typhimurium* LT2 die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Testsubstanzen. Aufgrund von Deletionen im Excisionsreparatursystem (*uvrB*) der Stämme TA97a, TA98 und TA100 können die Zellen viele DNA-Schäden nicht reparieren. Die *rfa*-Mutation (*deep rough factor*) führt zu einem teilweisen Verlust der Lipopolysaccharidschicht und damit zu einem veränderten Aufbau der Bakterienzellwand. Die Virulenz der Bakterien ist dadurch herabgesetzt. Außerdem können so relativ große Moleküle, die die Bakterienzellwand sonst nicht überwinden können, leichter in die Zelle diffundieren (Ames *et al.*, 1973; Maron und

Ames, 1983). *S. typhimurium*-Stämme mit dem Plasmid pKM101 (R-Faktor-Plasmid) besitzen nach der Induktion von DNA-Schäden eine erhöhte *error prone*-Aktivität. Man darf annehmen, daß das *muc*-Gen auf dem Plasmid pKM101 die Funktion der SOS-Gene *umuC* und *umuD* steuert, die von den Genprodukten der *recA* und *lexA*-Gene kontrolliert werden. Diese Gene gehören zum *SOS-repair*-System (Shanabru und Walker, 1980; Rossmann und Klein, 1988). Aufgrund der *error prone*-Aktivität steigen spontane und substanzinduzierte Mutationsraten (Maron und Ames, 1983).

4.6.1.2 Die Beziehung von Mutagenität und Kanzerogenität im Ames-Test

Der Ames-Test wurde mit der Intention entwickelt und in der genetischen Toxikologie eingeführt, das karzinogene Potential einer Substanz mit einem bakteriellen Mutagenitätstest mit vergleichsweise geringem experimentellen Aufwand *in vitro* zu prüfen. Man durfte Mitte der 70er Jahre annehmen, daß der Ames-Test mit einer Wahrscheinlichkeit von etwa 90% kanzerogene und nicht-kanzerogene Substanzen identifiziert. In einer klassischen vergleichenden Untersuchung waren 90% der kanzerogenen Substanzen mutagen und 87% der nicht kanzerogenen Substanzen nicht mutagen (McCann *et al.*, 1975). Nachfolgende Untersuchungen verwiesen auf den Zusammenhang zwischen der Sensitivität des Tests und der chemischen Klasse der Prüfsubstanzen (Rinkus und Legator, 1979; Kier *et al.*, 1986). Hinweise auf Mechanismen, die der Sensitivität und der Spezifität des Ames-Tests zugrunde liegen, brachte die Einteilung der Prüfsubstanzen aufgrund ihrer Struktur in solche, die direkt mit der DNA reagierten und nicht DNA-aktive Substanzen. Etwa 90% der kanzerogenen DNA-reaktiven Substanzen waren auch im Ames-Test mutagen, allerdings reagierten lediglich zwei von mehr als fünfzig nicht DNA-aktiven kanzerogenen Substanzen positiv (Ashby und Tennant, 1991). Der Ames-Test ist also nur für DNA-aktive Substanzen ein geeignetes Testsystem. Den Eigenschaften der Teststämme ist impliziert, daß Substanzen nicht als positiv zu identifizieren sind, die nur Chromosomen- oder Genommutationen, jedoch keine Gen-mutationen, bevorzugt Basenpaarsubstitutionen, induzieren.

4.6.2 Genmutationstests mit Säugetierzellen

In Genmutationstests an Säugetierzellen wird von erblichen funktionalen Veränderungen des Phänotyps einer Zelle auf Mutationen geschlossen. So können funktionale Änderungen eines Gens und deren Vererbbarkeit auf lebensfähige Nachkommen unmittelbar erfaßt werden. Die quantitative Bestimmung der Mutantenraten in kultivierten Zellen geschieht mit Selektionsverfahren. Es werden dazu Substanzen in das Kulturmedium eingebracht, die für die Ausgangszellen toxisch sind, mutierte Zellen hingegen sind resistent und wachsen deshalb nach kurzer Zeit zu Kolonien aus. Es wurden in den letzten Jahren mehrere Testsysteme mit Säugetierzellen für die routinemäßige Mutagenitätsprüfung etabliert. Die besonderen Anforderungen an die Zellen in Kultur - rasche Proliferation, Fähigkeit zu klonalem Wachstum und Stabilität des Karyotyps - führten zur bevorzugten Verwendung von Nagerzellen, den V79- und CHO-Zellen des Chinesischen Hamsters oder der Mauslymphomlinie L5178Y (Glatt, 1993; Aaron *et al.*, 1994).

V79-Zellen und CHO-Zellen sind permanente Zelllinien, die aus dem Lungengewebe (V79) und dem Ovar (CHO) des Chinesischen Hamsters stammen; sie wurden vor etwa dreißig Jahren erstmals in der Mutagenitätsprüfung verwendet (Chu und Malling 1968; Kao und Puck 1968). Den raschen Erfolg der Testsysteme auf den Gebieten der Mutagenitätsforschung und der Mutagenitätsprüfung beschreibt eine früh erschienene umfangreiche Übersichtsarbeit. Besonderheiten der Testkomponenten und eine Zusammenfassung der bis dahin publizierten Ergebnisse aus Prüfungen vieler natürlicher und synthetischer Substanzen sind darin detailliert dargestellt (Bradley *et al.*, 1981).

4.6.2.1 Der V79/HPRT-Genmutationstest

Empfehlungen zur Durchführung des V79/HPRT-Tests erschienen in mehreren Übersichtsartikeln (Bradley *et al.*, 1981; Nestmann *et al.*, 1991; Glatt 1994). Eigene Erfahrungen mit dem Test unter Berücksichtigung der spezifischen Fragestellungen und der

Labormöglichkeiten sind in Originalarbeiten eingegangen (Schweikl *et al.*, 1995; Schweikl und Schmalz, 1997).

Der HPRT-Test gliedert sich in die Abschnitte Exposition, Expression und Mutantenselektion. In der Phase der Exposition werden Zellen zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase mit der Prüfsubstanz behandelt. Die Expositionszeit kann bei direkter Prüfung (ohne S9-Fraktion) auf bis zu 72 Stunden ausgedehnt werden, wenn schlecht lösliche Substanzen geprüft werden oder wenn eine langsame, intrazelluläre enzymatische Aktivierung der Substanz nicht ausgeschlossen werden soll (Glatt, 1993). In Gegenwart einer metabolisch aktiven Mikrosomenfraktion (S9-Fraktion) ist es ratsam, die Expositionszeit wegen der möglichen Bildung von Toxinen und Mutagenen in der S9-Fraktion kurz zu halten (Myhr und Mayo, 1987). Für den quantitativen Vergleich mit Experimenten in Anwesenheit einer S9-Fraktion erfolgt die direkte Prüfung in gleicher Länge.

Die Toxizität einer Substanz im V79/HPRT-Test kann unmittelbar nach der Exposition oder zum Zeitpunkt der ersten Subkultivierung während der Expressionszeit, im Protokoll der vorliegenden Arbeit 24 Stunden nach Ende der Behandlungszeit, abgeschätzt werden (Glatt, 1993; Schweikl *et al.*, 1995). Mit dem Beginn der Expressionsphase werden substanzinduzierte DNA-Schäden, die nicht durch zelleigene Mechanismen repariert wurden, in Mutationen festgeschrieben. Der HPRT⁻-Phänotyp mutierter V79-Zellen wird nach dem Abbau der restlichen HPRTase-Aktivität in den Mutanten nach etwa sechs Tagen exprimiert (Jakobs *et al.*, 1983; Glatt, 1993). In der Phase der Selektion werden nach der Expressionsphase HPRT-Mutanten isoliert. Das Selektionsmedium enthält das für Zellen des Wildtyps toxische Guaninderivat 6-Thioguanin (6-TG) oder das 8-Azaguanin (8-AG). In der Regel wird 6-TG verwendet, das wegen der hohen Affinität der HPRTase gegenüber 6-TG einen höheren Selektionsdruck als 8-TG ausübt (Fox und Hodgkiss, 1981). In der Selektionsphase muß eine metabolische Kooperation der Zellen über *gap junctions* aufgrund hoher Zelldichten vermieden werden. Toxische Guaninderivate aus 6-TG oder 8-AG in HPRT-profizienten Zellen dürfen nicht in HPRT-defiziente eingeschleust

werden. Unter optimalen Kulturbedingungen können dann HPRT-defiziente Zellen nach etwa zehn Tagen Kulturzeit leicht als Kolonien erfaßt werden (Glatt, 1993).

Es wurde empfohlen, eine Substanz als mutagen einzustufen, wenn die induzierte Mutantenhäufigkeit um den Faktor 3 über der Zahl spontaner Mutanten liegt (Bradley *et al.*, 1981). Ergänzend dazu schlug eine Expertengruppe kürzlich vor, eine Substanz als mutagen zu klassifizieren, wenn sie eine Mutantenhäufigkeit induziert, die um mehr als zwanzig Mutanten (pro 10^6 Zellen) höher ist als die spontane Mutantenfrequenz (Aaron *et al.*, 1994). Gleichwohl sollte jedes Labor aufgrund eigener Erfahrungen und der eigenen historischen Daten für sich selbst einen Grenzbereich festlegen. Positive Befunde könnten durch statistische Analysen, Dosis-Wirkungsbeziehungen und Wiederholungsexperimente fundiert werden. Eindeutig positive Ergebnisse erfordern nicht unbedingt eine Bestätigung in einem Wiederholungsexperiment (Aaron *et al.*, 1994).

Der V79/HPRT-Genmutationstest wird heute gleichbedeutend neben anderen Tests, die mit Säugetierzellen durchgeführt werden, im Bericht der Arbeitsgruppe "Mammalian Gene Mutation Assays" im Rahmen des "International Workshop on Standardization of Genotoxicity Test Procedures" (Melbourne 1993) zur Durchführung von Mutagenitätsprüfungen empfohlen. Es bestand unter Experten aus Europa, USA und Japan die Ansicht, daß Genmutationen mit diesem Test zuverlässig nachgewiesen werden (Aaron *et al.*, 1994). Ein Positionspapier der deutschen "Gesellschaft für Umwelt- und Mutationsforschung (GUM)" teilte diese Auffassung (Glatt, 1994). Die Einschätzung beruht auf der großen Datenbasis, die für dieses Testsystem vorliegt (Bradley *et al.*, 1981). Auch OECD-Richtlinien zur Prüfung der Mutagenität von Chemikalien empfehlen und beschreiben ausführlich den Test (OECD, 1993).

4.6.2.2 V79-Zellen

Die Durchführung von Genmutationstests erfordert Zielzellen in großer Anzahl. Deshalb eignen sich für Routineprüfungen vor allem Zellen, die schnell proliferieren. Weil die Mutantenselektion und ihre Quantifizierung in Form resistenter Kolonien im selektiven Medium erfolgt, müssen die Zellen auch bei dünner Aussaat gut wachsen und in der Lage sein, Kolonien zu bilden. Bei Selektion mit 6-Thioguanin ist zusätzlich erforderlich, daß die Ausgangszellen nur ein funktionsfähiges *hprt*-Gen besitzen. Die Zielzellen müssen auch deshalb über lange Kulturzeiten einen stabilen Chromosomensatz behalten (Aaron *et al.*, 1994). Diese essentiellen Anforderungen an Zellen, die in Genmutationsexperimenten verwendet werden sollen, erfüllen V79-Zellen (Bradley *et al.*, 1981; Glatt, 1994).

Die heute verbreiteten V79-Wildtyp-Zellen wurden ursprünglich aus dem Lungengewebe eines Chinesischen Hamsters gewonnen (Ford und Yerganian, 1958). Aus diesen V79-Wildtyp-Zellen wurden wiederum verschiedene mutante Zelllinien isoliert. Mit ihnen werden Mechanismen der Entstehung von Mutationen studiert und zelluläre Komponenten analysiert, die an der Entstehung spontaner und fremdstoffinduzierter DNA-Schäden mitwirken (Collins, 1993). Wichtig ist hier auch die Fähigkeit der Zellen, DNA-Schäden zu reparieren. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten V79-Wildtyp-Zellen können DNA-Schäden reparieren. Mutationen resultieren daher direkt aus einem gesetzten DNA-Schaden und nicht aus seiner fehlerhaften Reparatur aufgrund von Defekten in den DNA-Reparaturmechanismen (Helbig, 1995).

Viele toxische und genotoxische Effekte werden nicht durch die ursprünglich in das Testsystem eingebrachte Substanz selbst sondern durch ihre Metabolite verursacht. Diese Metabolite entstehen überwiegend durch die vielen Reaktionsmechanismen der verschiedenen P450-Cytochrom-Isoenzyme des glatten endoplasmatischen Retikulums der Zielzellen (Goldstein und Faletto, 1993). Auch andere fremdstoffmetabolisierende Enzymaktivitäten sind für viele Säugetierzellen, die in toxikologischen Prüfungen verwendet werden bekannt. V79-Zellen in

Kultur haben allerdings die Fähigkeit verloren, die meisten fremdstoffmetabolisierenden Enzyme, insbesondere P450-Cytochrome, mit hoher Aktivität zu exprimieren (Glatt *et al.*, 1987). In Basisprüfungen werden deshalb den Zellkulturen fremdstoffmetabolisierende Enzymaktivitäten zugesetzt; üblicherweise ist dies eine metabolisch aktive Mikrosomenfraktion aus der Säugetierleber (S9-Fraktion), die verschiedene membranständige P450-Cytochrome enthält, deren Expression induzierbar ist (Krahn und Heidelberger; 1977; Kuroki *et al.*, 1977; Gonzales, 1989).

Genmutationstests können prinzipiell mit allen Typen von Säugetierzellen durchgeführt werden. Obwohl es für manche biologische *in vitro* Untersuchungen dentaler Werkstoffe wünschenswert erscheinen mag, wurden in der vorliegenden Arbeit aus praktischen Erwägungen keine primären Zellen des Mund-Rachenraumes (Pulpazellen, Gingivazellen, Zellen der Mundschleimhaut, etc.) verwendet. Die Nachteile primärer Zellen zur Durchführung von Genmutationsexperimenten ergeben sich leicht aus den oben für die V79-Zellen angeführten Anforderungen an Zielzellen. Zielzellen des Mund-Rachenraumes sind bisher zellbiologisch für die hier bearbeitete Fragestellung unzureichend charakterisiert. Die Charakterisierung ihres Wachstumsverhaltens, ihrer Klonierungseffizienz, der Chromosomenstabilität und verschiedenster Stoffwechselleistungen, die für den Fremdstoffmetabolismus bedeutsam sind oder etwa die Erforschung der Fähigkeit, primäre DNA-Schäden zu reparieren, gehen weit über den Rahmen dieser Arbeit hinaus. Primäre Zielzellen wurden kürzlich von internationalen Gremien aufgrund ungenügender Validierung explizit nicht zur Durchführung von Mutagenitätsprüfungen empfohlen (Aaron *et al.*, 1994).

4.6.2.3 Die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT), das *hprt*-Gen und die klinische Relevanz einer HPRT-Defizienz

Die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) ist ein Enzym des Purinstoffwechsels (*purine salvage pathway*). HPRT katalysiert die Synthese der Mononukleotide Inosinmonophosphat und Guanosinmonophosphat aus den Purinbasen Hypoxanthin und

Guanin, die aus dem enzymatischen Abbau von Nukleotiden stammen (*purine salvage*). Das *hprt*-Gen, das die kodierenden Sequenzen für das HPRT-Protein enthält, ist kein essentielles Gen, denn Zellen in Kultur müssen Purine nicht über den *purine salvage pathway* nutzen, sondern können sie auch *de novo* synthetisieren (Bradley *et al.*, 1981). Das *hprt*-Gen liegt beim Hamster auf dem X-Chromosom (Fenwick, 1980). Aufgrund der Hemizygotie der männlichen V79-Zellen führt bereits ein Mutationsereignis in einer V79-Zelle zur HPRT-Defizienz. Die unvollkommene Substratspezifität des HPRT-Proteins ist eine weitere wichtige Eigenschaft, die den *hprt*-Locus als Selektionsmarker in Genmutationsexperimenten eignet. Die toxischen Purinanaloga 6-Thioguanin, 6-Mercaptopurin und 8-Azaguanin werden ebenfalls zu Nukleotidmonophosphaten metabolisiert. Diese Derivate sind für V79-Wildtyp-Zellen letal (Krenitzky *et al.*, 1969). Mutanten mit HPRT-Defizienz hingegen sind resistent gegenüber Purinanalogen (wie 6-Thioguanin, 6-TG) und können im selektiven Kulturmedium isoliert werden (Bradley *et al.*, 1981; Glatt, 1993).

Die HPRT-Defizienz ist für den Menschen als die Ursache des Lesch-Nyhan-Syndroms, einer vererbten Krankheit, von klinischer Relevanz. Als Folge des gestörten Purinstoffwechsels werden Guanin und Hypoxanthin intrazellulär angereichert, mentale Retardierung, Selbstmutilation und spastische Zerebralparese sind die klinischen Symptome (Witkowski und Prokop, 1983). Sämtliche klinischen Symptome resultieren aus Defekten des *HPRT*-Gens. Größere Deletionen des Gens machen etwa ein Fünftel der Mutationstypen aus, die Mehrzahl der Defekte beruht auf kleinen Veränderungen der kodierenden Nukleotidsequenzen (Stout und Caskey, 1988).

5 Deletionsscreening des *hprt*-Gens in V79-Zellen mit Polymerase Chain Reaction

In den meisten der klassischen genetischen Methoden wird eine Mutation, die entweder spontan oder fremdstoffinduziert auftritt, aufgrund ihrer phänotypischen Expression nach Zellteilungen der mutierten Zelle im adäquaten Selektionsmedium erkannt. Der *Salmonella*-Mikrosomen-Test und der V79/HPRT-Test basieren auf diesem Prinzip. Lokalisation und Genese von Mutationen können mit diesen Verfahren allerdings nicht aufgeklärt werden, dazu bedarf es molekularer Methoden. Erst die Analysen mutagener Ereignisse auf molekularer Ebene tragen dazu bei, die Mechanismen induzierter DNA-Veränderungen zu verstehen (Rossiter und Caskey, 1990). Die Klonierung eines Gens, die Analyse der Struktur dieses Gens mit Southern blotting oder die Sequenzanalyse selbst sind heute gängige Methoden molekularer Analysen erblicher und fremdstoffinduzierter Mutationen (Eckardt-Schupp und Ahne, 1993). Punktmutationen als Transitionen oder Transversionen und Raster-schubmutationen (*frameshift*) als Folge von Insertionen oder Deletionen mehrerer Basenpaare oder größerer DNA-Sequenzen sind so zu analysieren. Große strukturelle Änderungen der genetischen Information in Form von Genduplikationen, Inversionen, Translokationen oder Gendeletionen sind vielfach die Ursache für die Entstehung von Tumoren und Erbkrankheiten (Ponder, 1988; Harris, 1991). Deletionen der kodierenden Sequenzen von Tumor-suppressorgenen oder anderer Gene, die maligne Erkrankungen zur Folge haben, sind beschrieben (Koenig *et al.*, 1989; Yen *et al.*, 1990; Marshall, 1991).

Das *hprt*-Gen ist für molekulare Analysen bestens geeignet. Es liegt bei Mensch, Maus, Ratte und Chinesischem Hamster auf dem X-Chromosom (Nyhan *et al.*, 1967; Chapman und Shows, 1976; Farrell und Worton, 1977; Stout und Caskey, 1985). In V79-Zellen ist nur eine funktionsfähige Kopie des Gens in jeder Zelle vorhanden; deshalb transformiert bereits ein mutagenes Ereignis eine Zelle des Wildtyps in eine mutierte Zelle (Chu und Malling, 1968; Stout und Caskey, 1985). Da zudem die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) für das

Überleben von Säugetierzellen nicht essentiell ist, weil Purine alternativ neu synthetisiert werden können, sind HPRT-defiziente Zellen relativ einfach im selektiven Kulturmedium zu isolieren (Bradley *et al.*, 1981). Die Struktur des *hprt*-Gens ist lange bekannt und molekular-genetischen Analysen zugänglich (Stout und Caskey, 1985; Rossiter *et al.*, 1991).

Ionisierende Strahlen induzierten in den meisten Fällen große Deletionen im *hprt*-Gen, die mit Southern Blot-Analysen leicht festzustellen waren. Selbst die Größe von Deletionen kodierender Sequenzen (Exons) konnte annähernd bestimmt werden (Thacker, 1986; Gibbs *et al.*, 1987; Morgan *et al.*, 1990). Weil jedoch in vielen Fällen eine Bande sehr häufig mehr als ein Exon enthält, kann der Ort von Exondeletionen mit Southern Blot-Analysen nicht zuverlässig bestimmt werden. Eine elegantere und meistens auch schnellere Möglichkeit, größere Deletionen oder Insertionen aber auch kleinere Änderungen in der Nukleotidsequenz eines Gens festzustellen, bietet die Technik der polymerase chain reaction (PCR) (Saiki *et al.*, 1985; Mullis und Faloona, 1987). Es ist sogar möglich, bei geschickter Wahl der Primer-sequenzen mehrere Sequenzen in einer einzigen PCR zu amplifizieren (Multiplex-PCR). So waren Deletionen kodierender Sequenzen schnell zu erfassen (Chamberlain *et al.*, 1988).

Diese Methode der Multiplex-PCR wurde auch zur Amplifizierung kodierender Sequenzen des *hprt*-Gens des Chinesischen Hamsters verwendet. Neun Exons, die auf einer Länge von insgesamt 36 kb auf der DNA verteilt sind, wurden in sieben DNA-Fragmenten amplifiziert. Das rasche Screening von Deletionsmutanten war auf diese Weise möglich; mit direkter Sequenzierung der Exonsequenzen konnten aber auch Punktmutationen schnell und relativ leicht ohne Subklonierung amplifizierter DNA-Fragmente erkannt werden (Xu *et al.*, 1989; Gibbs *et al.*, 1990; Rossiter *et al.*, 1991). Zudem wurde eine Methode zur Amplifizierung der gesamten kodierenden Region des *hprt*-Gens (cDNA) und zur direkten Analyse von Punktmutationen in der cDNA beschrieben (Yu *et al.*, 1992).

Mit PCR wurden in V79-Zellen auch eine Reihe von *hprt*-Mutationen analysiert, die chemisch induziert wurden. Bekannt starke Mutagene induzierten vorzugsweise Punktmutationen und *frameshift*-Mutationen (Zhang und Jensen, 1991; Wei *et al.*, 1991; Newton *et al.*, 1992; Wei *et al.*, 1993; Manjanatha *et al.*, 1993; Cochrane und Skopek, 1994). Erstaunlicherweise änderte sich die Art induzierter Mutationen nicht nur mit der Art der chemischen Substanz, sondern auch mit deren Konzentration. Beispielsweise erzeugten hohe (toxische) Benzo[a]pyren-Konzentrationen fast ausschließlich Mutationen an GC-Basenpaaren, niedrige (nicht toxische) Konzentrationen induzierten auch AT-Basenpaarmutationen (Wei *et al.*, 1991). Die in der Tumorthapie verwendeten Chemotherapeutika Bleomycin und Chlorambucil induzierten hauptsächlich Punktmutationen (Köberle *et al.*, 1991; Speit *et al.*, 1992). Das zytostatisch wirkende Adriamycin hingegen induzierte bevorzugt Deletionen verschiedener Größe, die über das gesamte *hprt*-Gen zufällig verteilt waren (Helbig *et al.*, 1994).

Spontan traten in V79-Zellen offensichtlich bevorzugt Punktmutationen auf, die einheitlich über das gesamte Gen verteilt waren. Alle Basenpaarsubstitutionen fand man mit Ausnahme der AT-Transversion in derselben Häufigkeit. Die Kulturbedingungen schienen keinen Einfluß auf das Mutationsgeschehen zu haben (Zhang *et al.*, 1992). Verschiedene V79-Wildtyp-Zellen (beispielsweise V79-MZ-Zellen und V79-UL-Zellen) unterschieden sich jedoch in der Rate spontan auftretender Deletionen. Während der Anteil der Deletionen an der Gesamtzahl spontaner Mutationen in V79-MZ-Zellen bei etwa vierzig Prozent lag, zeigten V79-UL-Zellen keine spontanen Deletionen. Der Anteil chemisch induzierter Deletionen war allerdings in beiden Wildtypzellen derselbe (Köberle *et al.*, 1993; Helbig *et al.*, 1994). Obwohl uns beide Zelllinien zur Verfügung standen, wurden für die molekulare Analyse TEGDMA-induzierter Mutationen nur die V79-UL-Zellen verwendet, um ausschließlich substanzinduzierte Deletionen zu erfassen.

III Fragestellung

Die Mutagenität von Monomeren zahnärztlicher Komposite auf Dimethacrylatbasis ist, Methymethacrylat ausgenommen, in der verfügbaren Literatur nicht beschrieben. Die vorliegende Arbeit analysiert deshalb die mutagenen Eigenschaften der Basismonomere Bisphenol A-Glycidylmethacrylat (Bis-GMA) und Urethandimethacrylat (UDMA), des Comonomers Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA), der Monomere Methymethacrylat (MMA) und 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) und der beiden Ausgangssubstanzen für die Synthese des Bis-GMA, Glycidylmethacrylat (GMA) und Bisphenol A (BPA). Die Experimente zur Prüfung der Mutagenität wurden mit zwei verschiedenen Genmutationstests, dem *Salmonella*-Mikrosomen-Test (Ames-Test) und dem V79/HPRT-Test, durchgeführt. Der Ames-Test ist ein bakterielles Testsystem, der HPRT-Test verwendet V79-Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters. Über die Prüfung der Mutagenität hinaus wurden TEGDMA-induzierte HPRT-defiziente V79-Zellklone isoliert und molekularbiologisch analysiert. Auf der Basis der Ergebnisse der Mutagenitätsexperimente wurde das mutagene Potential der Substanzen und die damit verknüpfte klinische Relevanz eingeschätzt. Im einzelnen wurden folgende Fragen bearbeitet:

1) Zytotoxizität der Kompositmonomere:

- Welche Konzentrationen der Kompositmonomere sind in V79-Zellen zytotoxisch und in welchem Konzentrationsbereich ist es deshalb sinnvoll, die Mutagenität der Kompositmonomere in V79-Zellen zu prüfen? Wie hoch ist die Zytotoxizität in V79-Zellen verglichen mit anderen Zelllinien?

2) Mutagenität der Kompositmonomere *in vitro*:

- Wie reagieren die verschiedenen *S. typhimurium*-Stämme TA97a, TA98, TA100 und TA102, die an verschiedenen Stellen des Histidin-Operons mutiert sind, auf die verschiedenen Kompositmonomere? Welchen Einfluß hat eine metabolisch aktive Mikrosomenfraktion (S9-Fraktion) auf die Mutagenität der Substanzen?
- Sind die Kompositmonomere in V79-Zellen mutagen und werden mutagene Effekte in Anwesenheit einer S9-Fraktion verändert?
- Welche Mechanismen bewirken unterschiedliche Resultate in den beiden Genmutationstests mit den Organismen unterschiedlicher phylogenetischer Organisations-höhe? Was leisten deshalb die beiden Genmutationstests oder die Protokolle ihrer Durchführung?
- Welche Strategien für die Prüfung der Mutagenität der Kompositmonomere im besonderen und zahnärztlicher Werkstoffe im allgemeinen folgen aus der Einschätzung der Leistungsfähigkeit der beiden Genmutationstests?

3) Molekulare Analyse substanzinduzierter HPRT-defizienter V79-Zellen:

- Welches Mutationsspektrum induziert ein Dimethacrylat im *hprt*-Gen der V79-Zellen im Vergleich zu spontan auftretenden Mutanten?
- Auf welchem Mechanismus basiert das induzierte Mutationsspektrum und ist dieser Mechanismus zu verallgemeinern?

IV Ergebnisse und Diskussion eigener Untersuchungen zur Zytotoxizität und Mutagenität von Kompositmonomeren

1 Zytotoxizität von Kompositmonomeren in V79-Zellen

Die Experimente zur Zytotoxizität von Kompositmonomeren wurden in der vorliegenden Arbeit vorwiegend aus zwei Gründen durchgeführt. Zum einen war die Reaktion der hier verwendeten V79-Zellen auf die Kompositmonomere bisher nicht bekannt, und es konnte a priori nicht angenommen werden, daß die V79-Zellen genauso reagieren würden wie die Zellen, die in vergleichbaren Untersuchungen anderer Autoren eingesetzt wurden. Zum anderen war es für die nachfolgenden Untersuchungen zur Mutagenität der Substanzen in Säugetierzellen *in vitro*, die ebenfalls mit den V79-Zellen durchgeführt werden sollten, notwendig, den angemessenen Konzentrationsbereich nach 24-stündiger Exposition zu kennen.

Die toxischen Wirkungen der Kompositmonomere in V79-Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters wurden in Dosis-Reaktionskurven ermittelt. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen einer Substanz in einem Experiment in je acht Parallelansätzen geprüft, insgesamt wurden je Substanz drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Im hier gewählten quantitativen kolorimetrischen Meßverfahren nach Kristallviolett-färbung der Zellen entsprechen die für die jeweiligen experimentellen Zellkulturen gemessenen Absorptionswerte der Zahl vitaler Zellen (Gilles *et al.*, 1986; Kueng *et al.*, 1989; Fox *et al.*, 1992).

Die Dosis-Reaktionskurve für UDMA zeigt die Überlebensraten der V79-Zellen eines typischen Experimentes, die als acht Einzelwerte je Konzentration der Testsubstanz nach 24-stündiger Exposition der Zellen aufgetragen wurden (Abb. 2). Die für jede Substanz charakteristischen TC50-Werte aus drei Experimenten, also diejenige Konzentration, die die Zahl vitaler Zellen in

der exponierten Zellkultur auf die Hälfte der Zellzahl unbehandelter Kulturen reduzierte, faßt Tabelle 2 zusammen. Diese TC50-Werte wurden den gefitteten Dosis-Reaktionskurven entnommen.

Das aromatische Basismonomer Bis-GMA war in V79-Zellen im Konzentrationsbereich von 0-75 $\mu\text{Mol/L}$ toxisch. Weniger als 10 $\mu\text{Mol/L}$ Bis-GMA reduzierten die Zahl vitaler Zellen auf etwa 90% verglichen mit unbehandelten Kulturen, bereits 50 $\mu\text{Mol/L}$ führten zu vollständigem Zelltod. Die TC50-Werte in drei voneinander unabhängigen Versuchen lagen zwischen 32-35 $\mu\text{Mol/L}$ (Tabelle 2). Die Toxizität des aliphatischen Basismonomers UDMA war dem des aromatischen Dimethacrylats Bis-GMA sehr ähnlich, eine typische Dosis-Reaktionskurve zeigt Abbildung 2. UDMA war im Konzentrationsbereich bis zu 250 $\mu\text{Mol/L}$ toxisch, die TC50-Werte waren mit 45-55 $\mu\text{Mol/L}$ etwas höher als diejenigen des Bis-GMA (Tabelle 2). Die toxischen Konzentrationen des Comonomers TEGDMA hingegen lagen um den Faktor 10-20 über denjenigen der Basismonomere. Etwa 0,25 mMol/L reduzierten die Zahl überlebender V79-Zellen nach 24-stündiger Exposition auf etwa 90% der Zahl unbehandelter Zellkulturen; wurden 2,5 mMol/L der Substanz eingesetzt, verblieben etwa 10% lebende Zellen. Die TC50-Werte wurden in einem Bereich von 0,5 -1.0 mMol/L ermittelt (Tabelle 2). Die Monomere Methylmethacrylat (MMA) und Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) waren wesentlich weniger toxisch als beide Basismonomere und das TEGDMA. Der toxische Konzentrationsbereich erstreckte sich über einen Bereich von 20 bis 30 mMol/L. Die TC50-Werte lagen für MMA zwischen 11-18 mMol/L, für HEMA bei etwa 6 mMol/L (Tabelle 2). Die zytotoxischen Konzentrationen der beiden Ausgangssubstanzen für die Synthese des Basismonomers Bis-GMA, Bisphenol A und Glycidylmethacrylat, waren trotz der unterschiedlichen chemischen Struktur der beiden Substanzen sehr ähnlich. Die TC50-Werte lagen für beide Substanzen etwa bei 0,2 bis 0,3 mMol/L (Tabelle 2).

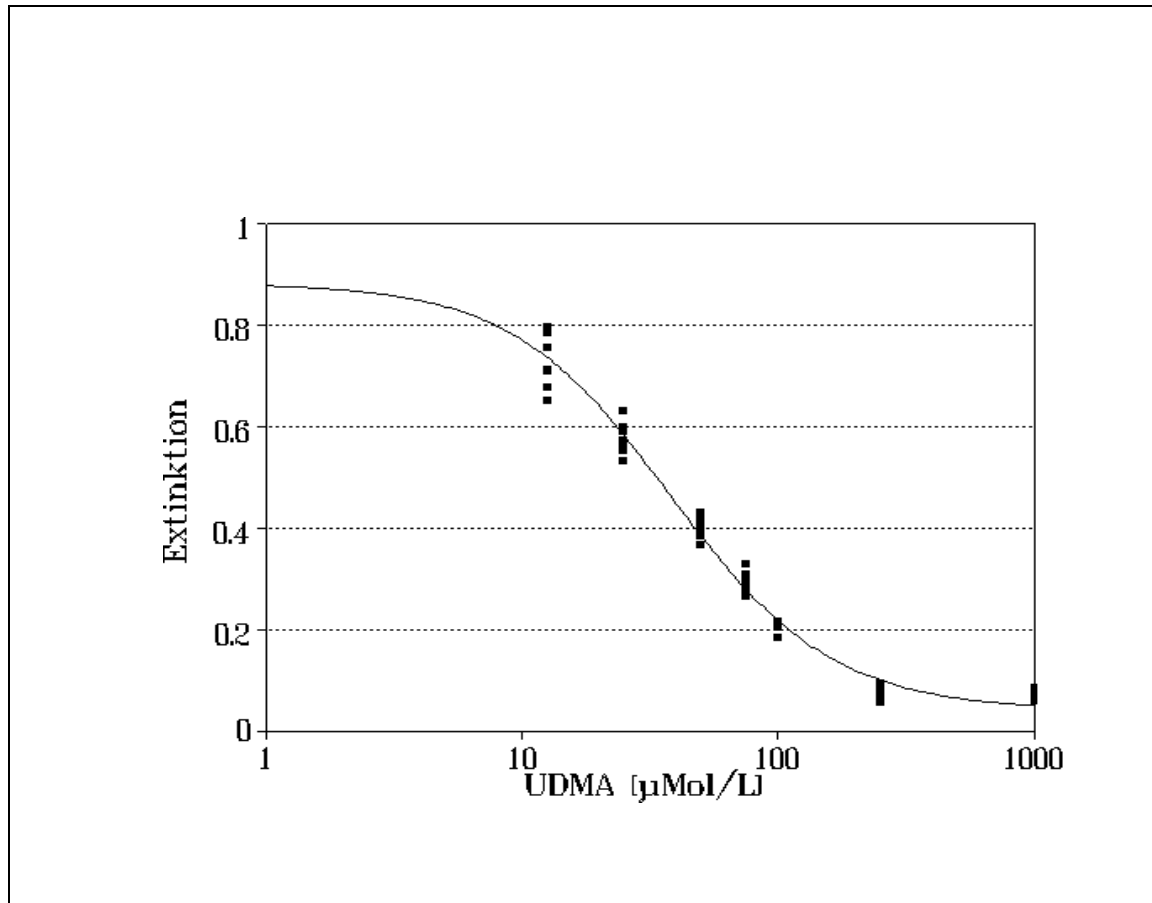


Abb. 2: Dosis-Reaktionskurve für das Urethandimethacrylat in V79-Zellen.

Tabelle 2: Die TC50-Werte der in der vorliegenden Arbeit mit V79-Zellen geprüften Kompositmonomere und Vorstufen (GMA und Bisphenol A). Es wurde die Zahl überlebender Zellen nach 24h Exposition und anschließender Färbung mit Kristallviolett gemessen. Dargestellt sind die Originalwerte (TC50-Werte) aus drei voneinander unabhängigen Versuchen nach Kurvenfit von Dosis-Reaktionskurven. Die TC50-Werte sind einheitlich in $\mu\text{Mol/L}$ angegeben. Die TC50-Werte für TEGDMA und HEMA wurden nach dem Lösen der Substanzen im wässrigen (Medium, Wasser) und im organischen Lösungsmittel gemessen. Experimentelle Einzelheiten zur Durchführung der Experimente und zur Ermittlung der TC50-Werte sind im Kapitel V beschrieben.

Substanz	TC50-Werte ($\mu\text{Mol/L}$)		
	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3
Bis-GMA	35,1	32,1	33,2
UDMA	54,9	54,0	45,1
Bisphenol A	230	170	190
GMA	220	280	270
TEGDMA (DMSO)	550	740	1000
TEGDMA (Medium)	520	920	620
HEMA (DMSO)	5800	6400	6500
HEMA (Wasser)	6800	8000	5900
MMA	18400	13200	11100

1.1 Zellarten, Expositionszeiten und TC50-Werte der Kompositmonomere

Verschiedene Verfahren, hier der Kristallviolett-Test, zum Nachweis vitaler oder überlebender Zellen nach Materialexposition, die an verschiedenen biologischen Endpunkten angreifen, können Unterschiede von TC50-Werten ergeben (Hanks *et al.*, 1991; Schweikl und Schmalz, 1996b). Klammert man den möglichen Einfluß unterschiedlicher Zellkulturmedien oder Seren auf die Zytotoxizität der Testsubstanzen, wie oben beschrieben, hier aus der Diskussion aus, so variierten die in der vorliegenden Arbeit ermittelten TC50-Werte der Kompositmonomere im

Vergleich zu Resultaten anderer Arbeitsgruppen wohl hauptsächlich deswegen, weil verschiedene Zellarten verwendet und verschieden lange Expositionszeiten gewählt wurden.

Nach einer Expositionszeit von 72 Stunden lagen die TC50-Werte für Bis-GMA, UDMA, HEMA und TEGDMA in 3T3 Mausfibroblasten etwa um den Faktor 2-6 unter den Werten, die nach 24 Stunden Exposition gemessen wurden. Wurde der TC50-Wert des Bis-GMA nach 24-stündiger Exposition mit etwa 10 $\mu\text{Mol/L}$ angegeben, sank dieser Wert nach 72 h auf etwa 3 $\mu\text{Mol/L}$. Der TC50 Wert für UDMA fiel von etwa 20 $\mu\text{Mol/L}$ auf etwa 10 $\mu\text{Mol/L}$, der des TEGDMA von etwa 120 $\mu\text{Mol/L}$ auf etwa 25 $\mu\text{Mol/L}$; auch der TC50-Wert des HEMA nahm von 3,6 mMol/L auf etwa 1.0 mMol/L ab (Ratanasathien *et al.*, 1995). Diese TC50-Werte liegen also in dem Konzentrationsbereich, der auch in der vorliegenden Arbeit gemessen wurde. Vergleicht man die TC50-Werte nach 24 Stunden Exposition in dieser Untersuchung mit einer früheren Arbeit derselben Arbeitsgruppe, in der erstmals absolute Konzentrationen verschiedenster Kompositmonomere bestimmt wurden, so fällt die sehr gute Reproduzierbarkeit der TC50-Werte in 3T3 Mausfibroblasten auf. Konzentrationen der Kompositmonomere zwischen 10 $\mu\text{Mol/L}$ für Bis-GMA und UDMA und 100 $\mu\text{Mol/L}$ für TEGDMA und GMA wurden als mäßig toxisch eingestuft (Hanks *et al.*, 1991). In der bisherigen Literatur nicht erwähnt, wurden nahezu identische TC50-Werte für Bis-GMA, UDMA und TEGDMA Jahre zuvor an L929-Zellen gemessen (Gans, 1986).

Die zum Teil höheren TC50-Werte der Kompositmonomere in der vorliegenden Arbeit verglichen mit Literaturdaten können auch an der verglichen mit anderen Zelltypen unterschiedlichen Sensitivität der V79-Zellen liegen. Es ist bekannt, daß verschiedene Zellarten etwas unterschiedlich auf Kompositmonomere reagieren können. Zellen des Immunsystems, Lymphozyten und Hilfszellen aus der Milz der Ratte oder T-Lymphozyten und Zellen der Pulpa reagierten auf GMA in niedrigeren Konzentrationen als die Mausfibroblasten. Umgekehrt war

Bisphenol A in den Zellen des Immunsystems weniger giftig. Für die Basismonomere (Bis-GMA und UDMA) und TEGDMA wurde allerdings kein Unterschied der TC50-Werte in diesen verschiedenen Zellarten gefunden (Jontell *et al.*, 1995). Der TC50-Wert für UDMA war auch in epidermalen Mukosazellen in etwa so hoch wie in 3T3 Mausfibroblasten (Nassiri *et al.*, 1994). Transformierte Odontoblastenzellen (MDPC-23) wiederum reagierten gegenüber Bis-GMA wie die V79-Zellen in der vorliegenden Arbeit (Hanks *et al.*, 1996). Ebenso stimmten die toxischen Konzentrationen des Methylmethacrylats in L929 Mausfibroblasten mit denjenigen der hier in V79-Zellen ermittelten überein (Schmalz, 1979). Primäre Zellen aus der humanen Gingiva und der Pulpa reagierten auf viele Komposit-monomere im beschriebenen Konzentrationsbereich, allerdings nach längerer Expositionszeit (Leyhausen *et al.*, 1997).

1.2 Lösungsmittel und TC50-Werte der Kompositmonomere

Wurden die Kompositmonomere nicht erst in einem organischen Lösungsmittel gelöst, wie hier und in den oben zitierten Arbeiten, und danach in Zellkulturmedien verdünnt, sondern sofort in Zellkulturmedium gelöst, fand man in Mauslymphomzellen für manche Substanzen eine Verschiebung zu höheren TC50-Werten. Die TC50-Werte für Bis-GMA und UDMA lagen nun etwa um den Faktor 100 über den in der vorliegenden Arbeit und in ähnlichen Untersuchungen gemessenen Werten. Dennoch waren beide Basismonomere deutlich toxischer als Methylmethacrylat. Andererseits waren die TC50-Werte des hydrophilen TEGDMA und des Methylmethacrylats fast identisch mit den hier gemessenen Werten (Geurtsen, 1988).

Lediglich das Comonomer TEGDMA, nicht die Basismonomere Bis-GMA und UDMA, wurde nach Extraktion eines Komposites in zytotoxischen Konzentrationen in Zellkulturmedien nachgewiesen (Geurtsen, 1988). TEGDMA war auch die toxische Komponente wässriger Extrakte von Kompositen, jedoch wurden auch überschüssiges, freies Bis-GMA und dessen

Zerfallsprodukte in zytotoxischen Konzentrationen aus einem Komposit extrahiert (Gerzina *et al.*, 1991, Rathbun *et al.*, 1991; Hume *et al.*, 1993; Gerzina und Hume, 1994). Dabei war die Menge eluierbarer Kompositmonomere abhängig vom Lösungsmittel (Rathbun *et al.*, 1991). Es wurde spekuliert, die *in vivo* wirksamen Lösungsmiteleigenschaften der Flüssigkeit in der Mundhöhle für Komposite könnten zwischen den guten Lösungsmiteleigenschaften von Ethanol oder Dimethylsulfoxid (DMSO) und dem vergleichsweise schlechten Lösungsmittel Wasser liegen (Ferracane, 1994).

Nicht immer muß jedoch die Wasserlöslichkeit der Kompositmonomere für die *in vivo* verfügbaren Mengen und toxischen Konzentrationen ausschlaggebend sein. Bedeutsam ist hier die Möglichkeit, daß in dem Gemisch der Monomere eine Substanz als Lösungsmittel für die jeweiligen anderen Komponenten dienen kann. Deshalb war die Entdeckung, daß die toxische Wirkung einer Kompositkomponente durch die Konzentrationen anderer Monomere modifiziert werden kann, nicht selbstverständlich. Es wurden konzentrationsabhängig synergistische, additive und antagonistische Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Kompositmonomeren gemessen. Antagonistische Effekte zwischen HEMA und Bis-GMA mit Bis-GMA-Konzentrationen unter 5 µMol/L reduzierten zytotoxische HEMA-Konzentrationen um 8% bis 20% nach kurzen Expositionszeiten (24 Stunden). Synergistische Wirkungen für alle HEMA-Konzentrationen wurden dann beobachtet, wenn die Bis-GMA-Konzentration größer als 25 µMol/L war. Allgemein führten längere Expositionszeiten von 72 Stunden zu synergistischen Wechselwirkungen, vor allem für die Kombination UDMA/TEGDMA. Bemerkenswerterweise wurden diese Wechselwirkungen in für die Einzelsubstanzen nicht-toxischen Konzentrationsbereichen beobachtet (Ratanasathien *et al.*, 1995). Wichtig ist also hier, daß es für die Beurteilung der Toxizität eines Komposites nicht unbedingt ausreicht, die zytotoxischen Konzentrationen der einzelnen Bestandteile des Werkstoffes zu kennen. Gerade synergistische Wechselwirkungen bedeuteten, daß toxische Effekte auf Pulpazellen in

Konzentrationsbereichen auftreten könnten, die weit unter den für die Einzelsubstanzen ermittelten liegen. In diesen Konzentrationen wurden manche Kompositmonomere *in vitro* aus Kompositen freigesetzt (Ratanasathien *et al.*, 1995).

1.3 Physiologisch relevante toxische Konzentrationen der Kompositmonomere

Die Konzentrationen freier nicht-polymerisierter Kompositmonomere in tiefen Kavitäten, in den Dentintubuli, dem äußeren Pulpagewebe oder auf den Oberflächen der Gewebe des Mundraumes sind nicht bekannt. Die klinische Relevanz der zytotoxischen Konzentrationen kann deshalb nur grob eingeschätzt werden. Eine Pulpaschädigung durch die Basismonomere Bis-GMA und UDMA oder durch das Comonomer TEGDMA kann nicht ausgeschlossen werden. Permeabilitätsmessungen an 0,45 mm dicken Dentinscheiben *in vitro* deuteten darauf hin, daß Bis-GMA aufgrund des Diffusionsgradienten im Dentin etwa um den Faktor 1500 verdünnt wurde. Dies würde bedeuten, daß die Ausgangskonzentration des Bis-GMAs in einer Kavität etwa 10 mg/ml oder 20 mMol/L betragen müßte, um annähernd TC50-Werte auf der pulpanahen Seite des Dentins zu erreichen (Hanks *et al.*, 1994). Der Einfluß einer Schmierschicht, der Odontoblasten und der Odontoblastenfortsätze, der Blutkapillaren oder des Gewebedruckes in der Pulpa auf die aktuellen Bis-GMA-Konzentrationen wurde in diese Überlegungen nicht einbezogen. Berücksichtigt man praktische Löslichkeitsgrenzen der Substanz in Zellkulturmedium von etwa 25 µg/ml (etwa 50 µMol/L), könnte Bis-GMA lediglich bei sehr viel dünneren Dentinscheiben zwischen Material und Zielzellen toxisch wirken. Ähnliche Überlegungen gelten für das TEGDMA (Hanks *et al.*, 1994). Den Angaben in der Publikation war allerdings nicht zu entnehmen, in welchem Zeitraum die Permeabilität der Moleküle bestimmt wurde. Es ist bekannt, daß Dentin die Diffusion des TEGDMA unmittelbar nach Applikation verzögerte, bereits nach 3 Tagen jedoch etwa 60% der direkt in wässriges Medium abgegebenen TEGDMA-Mengen auch durch das Dentin diffundiert waren (Gerzina und Hume, 1994).

Eine experimentelle Grundlage, die physiologisch relevanten zytotoxischen Konzentrationen von Kompositmonomeren abzuschätzen, erbrachten Permeabilitätsmessungen mit HEMA durch Dentin in einer *in vitro* Pulpakammer in Kombination mit der anschließenden Bestimmung der TC50-Werte. Wurden nach 12-stündiger Exposition von Mausfibroblasten noch etwa 13 mMol/L HEMA benötigt um 50% der Zellen zu töten, sank der TC50 nach einer 24-stündigen Exposition auf etwa 4 mMol/L. Aufgrund der Diffusionsgeschwindigkeit des HEMAs durch Dentin wurde das Risiko, mit dem HEMA toxische Effekte *in vivo* verursachen könnte, abgeschätzt. Nach Applikation eines Dentinklebers, der 50% HEMA enthielt, diffundierte HEMA durch eine etwa 1 mm dicke geätzte Dentinscheibe. Unter Berücksichtigung des experimentell ermittelten Verdünnungsfaktors von 2500 bis 200000 (ohne oder mit Pulpagedruck), wurde die in der Pulpa wirksame HEMA-Konzentration mit etwa 0,2 bis 1,6 mMol/L angegeben. Diese Konzentration dürfte also nicht ausreichen, nach 12 oder 24 Stunden Exposition akute toxische Effekte auszulösen. Dünnere Dentinscheiben zwischen Zellen und Material über eine längere Expositionsdauer könnten allerdings toxische Effekte des HEMA und des TEGDMA vielleicht nicht verhindern (Bouillaguet *et al.*, 1996; Hanks *et al.*, 1996; Fitzgerald und Hanks, 1997). Andere biologische Effekte, beispielsweise die Änderung der Genexpressionsrate pulpaler Zellen, mutagene Effekte oder andere subtoxische Modifizierungen des Stoffwechsels von Pulpazellen können selbstverständlich gegenwärtig nicht ausgeschlossen werden.

Aus den Untersuchungen zur Zytotoxizität von Kompositmonomeren sind TC50-Werte bekannt, die für eine bestimmte Expositionszeit die Schwelle zum subtoxischen Konzentrationsbereich markieren. Damit ist die Diskussion um physiologisch relevante Konzentrationen *in vivo* erst eröffnet. Toxische Kompositmonomere und ihre Konzentrationen wurden, wie oben beschrieben, identifiziert. Es konnten auf dieser Grundlage nun auch biologische Effekte ernsthaft untersucht werden, die möglicherweise im subtoxischen Konzentrationsbereich *in vivo* ausgelöst werden. Die Diskussion östrogenen Effekte und Veränderungen der Genexpression, der Phasen des Zellzyklus oder des Lipidstoffwechsels unter dem Einfluß von Kompositmonomeren sind hier neue Forschungsgebiete. Auf die Beschreibung mutagener

Effekte wichtiger Kompositmonomere wird an dieser Stelle anhand eigener Ergebnisse, die mit zwei verschiedenen Genmutationstests erzielt wurden, eingegangen.

2 Die Mutagenität von Monomeren zahnärztlicher Komposite im Ames-Test

Für die Prüfung der Mutagenität verschiedener Kompositmonomere im Ames-Test wurden die Teststämme *S. typhimurium* TA97a, TA98, TA100 und TA102 verwendet. Steigende Konzentrationen der Substanzen wurden mit und ohne Zusatz einer metabolisch aktiven Mikrosomenfraktion aus der Rattenleber (S9 Fraktion) getestet. Es wird empfohlen, daß die höchste Konzentration einer Prüfsubstanz toxisch für die Bakterien sein sollte oder aber es sollte mindestens eine Substanzmenge eingesetzt werden, die im Testsystem präzipitiert (Gatehouse *et al.*, 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde entsprechend verfahren, und jede Substanz in mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen geprüft. Die Resultate eines Experimentes sind im folgenden tabellarisch dargestellt.

2.1 Die Basismonomere Bisphenol A-Glycidylmethacrylat (Bis-GMA) und Urethandimethacrylat (UDMA) im Ames Test

Die Basismonomere Bisphenol A-Glycidylmethacrylat (Bis-GMA) und Urethandimethacrylat (UDMA) wurden zunächst in Dimethylsulfoxid gelöst (0,1 g/2 ml), anschließend wurde bis hin zu Substanzmengen geprüft, die im Testsystem präzipitierten. Beide Substanzen waren in keinem der *S. typhimurium*-Stämme TA97a, TA98, TA100 und TA102 weder mit noch ohne den Zusatz einer metabolisch aktiven Mikrosomenfraktion (S9-Fraktion) mutagen. Die Ergebnisse aus einem Experiment ohne den Zusatz einer S9-Fraktion sind dargestellt (Tabellen 4 und 5), diejenigen mit S9-Fraktion sind nicht gezeigt, weil beide Prüfsubstanzen nicht zu Mutagenen aktiviert wurden.

Tabelle 4: Bisphenol A-Glycidylmethacrylat (Bis-GMA) im Ames-Test nach direkter Prüfung. Originaleluate (0,1 g Bis-GMA/2 ml DMSO) wurden in DMSO verdünnt; Aliquots daraus wurden geprüft und sind hier in mg/Platte angegeben. Die Zahlen für die Revertanten/Platte der *S. typhimurium*-Stämme TA97a, TA98, TA100 und TA102 sind Mittelwerte (\pm S.D) aus drei Parallelansätzen. Als positive Kontrollsubstanzen wurden 0,5 μ g 2,4,7-Trinitrofluorenon/Platte (TA97a, TA98), 10 μ g NaN₃ / Platte (TA100) und 100 μ l 0,05% Glutaraldehyd/Platte (TA102) eingesetzt. ¹⁾ toxisch, ²⁾ Präzipitat

Bis-GMA (mg/Platte)	Revertanten / Platte			
	TA97a	TA98	TA100	TA102
0	154 \pm 26	29 \pm 6	125 \pm 18	178 \pm 15
0,5	133 \pm 16	24 \pm 2	133 \pm 14	226 \pm 25
1,25	131 \pm 26	25 \pm 3	139 \pm 26	207 \pm 22
2,5	136 \pm 6 ²⁾	27 \pm 3 ²⁾	127 \pm 8 ²⁾	182 \pm 33 ²⁾
5	128 \pm 66 ^{1,2)}	18 \pm 5 ^{1,2)}	124 \pm 13 ²⁾	170 \pm 29 ²⁾
12,5	116 \pm 7 ^{1,2)}	14 \pm 6 ^{1,2)}	113 \pm 11 ^{1,2)}	160 \pm 21 ^{1,2)}
positive Kontrolle	1282 \pm 144	917 \pm 221	1150 \pm 670	1016 \pm 37

Tabelle 5: Urethandimethacrylat (UDMA) im Ames-Test nach direkter Prüfung. Originaleluate (0,1 g UDMA/2 ml DMSO) wurden in DMSO verdünnt; Aliquots daraus wurden so wie für das Bis-GMA beschrieben geprüft. ¹⁾ toxisch, ²⁾ Präzipitat

UDMA (mg/Platte)	Revertanten / Platte			
	TA97a	TA98	TA100	TA102
0	141 \pm 16	29 \pm 6	126 \pm 10	296 \pm 55
0,5	166 \pm 14	22 \pm 3	164 \pm 12	223 \pm 25
1,25	146 \pm 17 ²⁾	25 \pm 1 ²⁾	159 \pm 10 ²⁾	262 \pm 48 ²⁾
2,5	126 \pm 23 ²⁾	22 \pm 6 ²⁾	157 \pm 17 ²⁾	218 \pm 24 ²⁾
5	93 \pm 18 ²⁾	21 \pm 3 ²⁾	150 \pm 22 ²⁾	236 \pm 43 ²⁾
12,5	109 \pm 32 ^{1,2)}	21 \pm 11 ^{1,2)}	137 \pm 9 ²⁾	257 \pm 30 ^{1,2)}
positive Kontrolle	959 \pm 35	917 \pm 221	1343 \pm 38	611 \pm 91

2.2 Methylmethacrylat und 2-Hydroxyethylmethacrylat im Ames-Test

Zur vollständigen Darstellung der mutagenen Wirkungen von Kompositmonomeren im Ames-Test wurden die Daten zur Mutagenität der beiden Monomere Methylmethacrylat (MMA) und 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) einer früheren Veröffentlichung entnommen und hier nochmals dargestellt (Schweikl *et al.*, 1994). MMA und HEMA waren in keinem der vier *S. typhimurium*-Stämme weder mit noch ohne den Zusatz einer S9-Fraktion mutagen. Die Daten für die Experimente, die ohne S9 Fraktion durchgeführt wurden, sind dargestellt (Tabellen 6 und 7).

Tabelle 6: Methylmethacrylat (MMA) im Ames-Test nach direkter Prüfung. Originaleluat (0,1 g MMA/2 ml DMSO) wurden in DMSO verdünnt; Aliquots daraus wurden geprüft und sind hier in mg/Platte angegeben. Es wurde wie für die Experimente mit Bis-GMA beschrieben verfahren. Die Werte wurden einer eigenen Publikation entnommen (Schweikl *et al.*, 1994). ¹⁾ toxisch

MMA (mg/Platte)	Revertanten / Platte			
	TA97a	TA98	TA100	TA102
0	146 ± 8	28 ± 2	149 ± 9	239 ± 23
0,05	154 ± 10	26 ± 3	130 ± 6	264 ± 3
0,5	141 ± 4	24 ± 5	129 ± 15	256 ± 15
5	127 ± 7	24 ± 5	112 ± 7	258 ± 10
12,5				274 ± 13
25				230 ± 3 ¹⁾
positive Kontrolle	1525 ± 127	1553 ± 98	1049 ± 77	627 ± 35

Tabelle 7: 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) im Ames-Test nach direkter Prüfung. Originaleluate (0,1 g HEMA/2 ml DMSO) wurden in DMSO verdünnt und Aliquots daraus wurden geprüft. Es wurde wie für die Experimente mit Bis-GMA beschrieben verfahren. Die Werte wurden einer eigenen Publikation entnommen (Schweikl *et al.*, 1994). ¹⁾ toxisch

HEMA (mg/Platte)	Revertanten / Platte			
	TA97a	TA98	TA100	TA102
0	146 ± 19	35 ± 5	141 ± 8	333 ± 24
0,05	154 ± 3	37 ± 4	141 ± 12	351 ± 15
0,5	153 ± 16	35 ± 7	144 ± 5	337 ± 9
5	127 ± 15	32 ± 3	134 ± 12	313 ± 3
12,5				314 ± 22
25				252 ± 50 ¹⁾
positive Kontrolle	1525 ± 127	1533 ± 98	1049 ± 77	627 ± 35

2.3 Bisphenol A im Ames-Test

Bisphenol A war im Ames-Test weder mit noch ohne den Zusatz einer S9-Fraktion mutagen. Die Zahlen der Revertanten blieben in allen Teststämmen im nicht-toxischen Bereich mit steigenden Mengen an Bisphenol A konstant und sanken erst im toxischen Konzentrationsbereich. Die Tabelle 8 zeigt die Revertantenzahlen in einem Experiment ohne den Zusatz einer S9-Fraktion, die Daten aus den Ansätzen in Gegenwart von S9 sind nicht gezeigt.

Tabelle 8: Bisphenol A (BPA) im Ames-Test nach direkter Prüfung. Originaleluate (0,1 g BPA/2 ml DMSO) wurden in DMSO verdünnt und Aliquots daraus wurden geprüft. Die Zahlen für die Revertanten/Platte der *S. typhimurium*-Stämme TA97a, TA98, TA100 und TA102 sind Mittelwerte (\pm S.D) aus drei Parallelansätzen. Als positive Kontrollsubstanzen wurden 0,5 μ g 2,4,7-Trinitrofluorenon/Platte (TA97a, TA98), 10 μ g NaN₃ / Platte (TA100) und 100 μ l 0,05% Glutaraldehyd/Platte (TA102) eingesetzt. ¹⁾ toxisch

BPA (mg/Platte)	Revertanten / Platte			
	TA97a	TA98	TA100	TA102
0	141 \pm 12	31 \pm 7	125 \pm 18	296 \pm 55
0,05	176 \pm 18	31 \pm 6	150 \pm 26	296 \pm 54
0,125	119 \pm 28	34 \pm 4	132 \pm 34	353 \pm 43
0,25	162 \pm 19	28 \pm 3	95 \pm 14	268 \pm 58
0,5	88 \pm 6 ¹⁾	9 \pm 3 ¹⁾	61 \pm 35 ¹⁾	215 \pm 61 ¹⁾
positive Kontrolle	959 \pm 35	2188 \pm 122	1150 \pm 67	611 \pm 91

2.4 Glycidylmethacrylat im Ames-Test

Das Glycidylmethacrylat (GMA) ist im Ames-Test mutagen. Es induzierte in *S. typhimurium* TA 97a, TA100 und TA102 einen unterschiedlich starken dosisabhängigen Anstieg der Revertantenzahlen. In *S. typhimurium* TA 98 war die Substanz in Abwesenheit einer metabolisch aktiven Mikrosomenfraktion (S9-Fraktion) nicht mutagen. In den Experimenten, die ohne S9-Fraktion durchgeführt wurden, stiegen die Zahlen der Revertanten der Stämme TA97a und TA102 etwa um den Faktor 2-3. Die Revertantenzahlen des Stammes TA100 lagen sogar mindestens um den Faktor 8 über die Zahl der spontanen Revertanten, wurden 1,25 oder 5 mg GMA pro Platte geprüft. Bei noch höheren GMA-Mengen wirkte die Substanz in allen Stämmen toxisch (Tabelle 9). In Anwesenheit einer S9-Fraktion reagierten die Stämme TA97a, TA102 und TA100 mit etwas höheren Revertantenzahlen als ohne S9 und sogar in TA98 wurde ein leichter Anstieg der Revertantenzahlen beobachtet (Tabelle 10).

Tabelle 9: Glycidylmethacrylat (GMA) im Ames-Test nach direkter Prüfung. Originaleluate (0,1 g GMA/2 ml DMSO) wurden in DMSO verdünnt; Aliquots daraus wurden geprüft und sind hier in mg/Platte angegeben. Die Zahlen für die Revertanten/Platte der *S. typhimurium*-Stämme TA97a, TA98, TA100 und TA102 sind Mittelwerte (\pm S.D) aus drei Parallelansätzen. Als positive Kontrollsubstanzen wurden 0,5 μ g 2,4,7-Trinitrofluorenon/Platte (TA97a, TA98), 10 μ g NaN_3 / Platte (TA100) und 100 μ l 0,05% Glutaraldehyd/Platte (TA102) eingesetzt. ¹⁾ toxisch

GMA (mg/Platte)	Revertanten / Platte			
	TA97a	TA98	TA100	TA102
0	119 \pm 24	30 \pm 5	239 \pm 12	273 \pm 48
0,25	197 \pm 71	28 \pm 5	657 \pm 27	284 \pm 21
0,5	201 \pm 36	35 \pm 7	976 \pm 57	456 \pm 22
1,25	349 \pm 117	35 \pm 6	1577 \pm 71	416 \pm 71
5	108 \pm 91 ¹⁾	29 \pm 10	1961 \pm 304	694 \pm 125
12,5	0 \pm 0 ¹⁾	12 \pm 16 ¹⁾	873 \pm 56 ¹⁾	115 \pm 47 ¹⁾
positive Kontrolle	1455 \pm 37	2267 \pm 87	1586 \pm 196	1130 \pm 91

Tabelle 10: Glycidylmethacrylat (GMA) im Ames-Test in Anwesenheit einer S9-Fraktion. Die Zahlen für die Revertanten/Platte der *S. typhimurium*-Stämme TA97a, TA98, TA100 und TA102 sind Mittelwerte (\pm S.D) aus drei Parallelansätzen. Als positive Kontrollsubstanz wurden 10 μ g 2-Amino-Anthracen eingesetzt. ¹⁾ toxisch

GMA (mg/Platte)	Revertanten / Platte			
	TA97a	TA98	TA100	TA102
0	144 \pm 24	33 \pm 11	225 \pm 16	372 \pm 20
0,25	204 \pm 17	40 \pm 3	927 \pm 16	557 \pm 62
0,5	179 \pm 62	34 \pm 2	1012 \pm 156	577 \pm 32
1,25	297 \pm 23	42 \pm 8	1640 \pm 238	696 \pm 50
5	396 \pm 66	54 \pm 12	2340 \pm 159	1151 \pm 108
12,5	183 \pm 11 ¹⁾	53 \pm 10	2482 \pm 197	735 \pm 391 ¹⁾
positive Kontrolle	908 \pm 35	1446 \pm 24	1904 \pm 151	1774 \pm 136

2.5 Das Comonomer Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) im Ames-Test

Das Comonomer Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) induzierte in keinem der *S. typhimurium*-Stämme Mutantenraten, die über der Rate der Spontanreversion lagen. Erstaunlicherweise sank die Zahl der spontanen Revertanten in den Experimenten, die ohne eine S9-Fraktion durchgeführt wurden bei höheren, jedoch noch nicht toxischen TEGDMA-Konzentrationen. Vor allem in den sensitiven Stämmen TA97a und TA102 war die Zahl spontaner Revertanten bei noch gesundem Hintergrundrasen reduziert. Wurde noch mehr TEGDMA auf die Platten aufgebracht, zeigte ein noch vorhandener aber bereits geschädigter Hintergrundrasen an, daß TEGDMA-Mengen bis in den toxischen Bereich hinein geprüft wurden (Tabelle 11). In Anwesenheit einer S9-Fraktion erreichte die Zahl von Revertanten in den Ansätzen mit 12,5 mg TEGDMA/Platte in fast allen Stämmen die üblichen Werte für die Zahl der spontanen Revertanten (Tabelle 12). Die Toxizität des TEGDMA war also hier deutlich reduziert. Dies ist ein Hinweis auf eine enzymatische Modifizierung des TEGDMA in Anwesenheit einer metabolisch aktiven Mikrosomenfraktion.

Tabelle 11: Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) im Ames-Test nach direkter Prüfung. Originaleluate (0,1 g TEGDMA/2 ml DMSO) wurden in DMSO verdünnt; Aliquots daraus wurden geprüft und sind in mg/Platte angegeben. Die Zahlen für die Revertanten/Platte der *S. typhimurium*-Stämme TA97a, TA98, TA100 und TA102 sind Mittelwerte (\pm S.D) aus drei Parallelansätzen. Als positive Kontrollsubstanzen wurden 0,5 μ g 2,4,7-Trinitrofluorenon/Platte (TA97a, TA98), 10 μ g NaN₃ / Platte (TA100) und 100 μ l 0,05% Glutaraldehyd/Platte (TA102) eingesetzt.; ¹⁾ toxisch; ²⁾ nicht toxisch

TEGDMA (mg/Platte)	Revertanten / Platte			
	TA97a	TA98	TA100	TA102
0	127 \pm 21	30 \pm 5	155 \pm 18	289 \pm 18
0,5	156 \pm 24	31 \pm 3	149 \pm 9	203 \pm 57
1,25	136 \pm 16	33 \pm 5	140 \pm 1	210 \pm 13
2,5	34 \pm 8	28 \pm 3	156 \pm 34	179 \pm 41
5	34 \pm 8 ²⁾	27 \pm 1	132 \pm 22	89 \pm 32 ²⁾
12,5	33 \pm 14 ²⁾	4 \pm 3 ¹⁾	25 \pm 16 ¹⁾	0 ¹⁾
positive Kontrolle	1681 \pm 122	2267 \pm 87	728 \pm 50	1148 \pm 132

Tabelle 12: Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) im Ames-Test in Anwesenheit einer S9-Fraktion. Die Zahlen für die Revertanten/Platte der *S. typhimurium* -Stämme TA97a, TA98, TA100 und TA102 sind Mittelwerte (\pm S.D) aus drei Parallelansätzen. Als positive Kontrollsubstanz wurden 10 μ g 2-Amino-Anthracen eingesetzt. ¹⁾ toxisch

TEGDMA (μ l / Platte)	Revertanten / Platte			
	TA97a	TA98	TA100	TA102
0	158 \pm 17	33 \pm 11	184 \pm 23	480 \pm 26
0,5	204 \pm 16	38 \pm 2	203 \pm 16	303 \pm 50
1,25	192 \pm 30	35 \pm 7	233 \pm 29	361 \pm 17
2,5	195 \pm 6	33 \pm 3	253 \pm 21	317 \pm 4
5	211 \pm 11	29 \pm 3	266 \pm 16	329 \pm 34
12,5	215 \pm 15	28 \pm 6 ¹⁾	168 \pm 41 ¹⁾	109 \pm 36 ¹⁾
positive Kontrolle	1725 \pm 147	1446 \pm 24	360 \pm 152	1553 \pm 34

3 Die Mutagenität von Monomeren zahnärztlicher Komposite im V79/HPRT-Test

Die Mutagenität der Kompositmonomere wurde im V79/HPRT-Test in zwei verschiedenen Behandlungsprotokollen untersucht. Zunächst wurde für eine direkte Prüfung (ohne S9) wie für die Bestimmung der Zytotoxizität der Substanzen in V79-Zellen (siehe oben) eine Expositionszeit von 24 Stunden gewählt. In dieser Zeit haben die exponierten Zellen mindestens einen Zellteilungszyklus durchlaufen. Im Unterschied dazu wurde der Einfluß einer S9-Fraktion auf die Mutagenität der Substanzen nach einer relativ kurzen Expositionszeit von nur 4 Stunden gemessen, um die Gefahr der Bildung von Toxinen und Mutagenen aus Bestandteilen der S9-Fraktion gering zu halten (Myhr und Mayo, 1987; Aaron *et al.*, 1994). In sämtlichen Experimenten wurde die V79-Wildtyp-Zelllinie V79B verwendet (Helbig, 1995). Jede Substanz wurde in mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen mit in der Regel drei verschiedenen Konzentrationen in den Langzeitexperimenten (24 Stunden Exposition) getestet. Jede Konzentration wurde pro Versuch einmal geprüft. Die Konzentrationen der Testsubstanzen schlossen dabei den oben beschriebenen Konzentrationsbereich der akuten Zytotoxizitäten ein (Aaron *et al.*, 1994). In Experimenten in Anwesenheit einer S9-Fraktion wurden aufgrund der bekannten Resultate aus den Langzeitexperimenten teilweise nur zwei Konzentrationen mitgeführt, um den großen experimentellen Aufwand zu ökonomisieren.

Die Zytotoxizität der einzelnen Kompositmonomere wurde im HPRT-Mutagenitätstest 24 Stunden nach Exposition auf zwei Arten bestimmt. Zum einen wurden die Gesamtzahlen der Zellen in behandelten Kulturen und in unbehandelten Kontrollen ermittelt. Zum anderen wurden zur Bestimmung der Überlebensraten behandelte und unbehandelte Kulturen pro Kultur 300 Zellen in drei Parallelansätzen unter Standardbedingungen kultiviert und die Anzahl der Kolonien wurde gezählt (*plating efficiency* 1, PE1). Für die Bestimmung der Mutantenrate pro 10^6 überlebender Zellen wurde die Zahl der 6-Thioguanin resistenten Mutanten pro Behandlungseinheit zur Zahl der lebensfähigen Zellen derselben Kultur zu Beginn der

Selektionsphase (*plating efficiency* 2, PE2), ins Verhältnis gesetzt. Diese Zahl lebensfähiger Zellen zu Beginn der Selektionsphase (PE2) wurde wie die Zytotoxizität am Ende der Behandlungsphase (PE1) als ihre Fähigkeit, Kolonien zu bilden, bestimmt.

3.1 Das Basismonomer Bisphenol A-Glycidylidimethacrylat (Bis-GMA) im V79/HPRT-Test

Das Basismonomer Bisphenol A-Glycidylidimethacrylat (Bis-GMA) reduzierte nach einer Behandlungszeit von 24 Stunden und direkter Exposition (ohne S9-Fraktion) die absoluten Zellzahlen und die Überlebensraten (*plating efficiencies*, PE1) der V79-Zellen mit steigenden Konzentrationen. Bei einer Bis-GMA-Konzentration von 75 µMol/L lagen die Überlebensraten bei 40% (PE1) verglichen mit den Werten der unbehandelten Kulturen, zum Zeitpunkt der Mutantenselektion (PE2) wurde keine Toxizität gemessen. Es wurde kein Anstieg der Zahl 6-TG resistenter Zellklone beobachtet und die Mutantenfrequenz war deshalb nicht dosisabhängig erhöht (Tabelle 13). Bis-GMA war im geprüften Konzentrationsbereich in V79-Zellen nicht mutagen.

In Experimenten in Anwesenheit einer metabolisch aktiven Mikrosomenfraktion (S9-Fraktion) wurden die V79-Zellen der Prüfsubstanz nur 4 Stunden exponiert. Nach dieser kurzen Behandlungszeit mit Bis-GMA waren auch die Überlebensraten der V79-Zellen (PE1) nach direkter Exposition etwa so hoch wie nach der 24-stündigen Exposition. Die Zytotoxizität des Bis-GMA und die sämtlicher anderer geprüften Substanzen (siehe unten) war in Gegenwart einer S9-Fraktion geringer als in den Ansätzen der direkten Prüfung (Tabelle 14). Auch in Anwesenheit von S9 wurden keine höheren Zahlen 6-TG resistenter Zellklone beobachtet. Bis-GMA wurde nicht zu einer mutagenen Substanz in V79-Zellen aktiviert.

Tabelle 13. Bisphenol A-Glycidylmethacrylat (Bis-GMA) im HPRT-Test (V79B-Zellen) nach direkter Exposition für 24 h.

V79B-Zellen wurden mit steigenden Bis-GMA-Konzentrationen behandelt. Überlebensraten und Mutantenraten sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten, die ohne S9-Fraktion durchgeführt wurden. Als positive Kontrollsubstanz wurde Methansulfonsäureethylester (EMS) verwendet.

Bis-GMA ($\mu\text{Mol/L}$)	Zellzahl (%)	PE1 (%)	PE2 (%)	Mutantenrate ($\times 10^{-6}$)
0	100	100	100	6
25	91	122	98	6
50	36	84	92	6
75	21	41	111	2
EMS (200 $\mu\text{g/ml}$)			95	635

Tabelle 14: Bisphenol A-Glycidylmethacrylat (Bis-GMA) im HPRT-Test (V79B-Zellen) nach 4 h Exposition mit und ohne S9-Fraktion (10%). Als positive Kontrollsubstanzen wurden Methansulfonsäureethylester (EMS, 200 $\mu\text{g/ml}$) in den Ansätzen ohne S9-Fraktion und 9-10-Dimethyl-1,2-Benzanthracen (DMBA, 30 $\mu\text{g/ml}$) in Versuchen mit S9-Fraktion verwendet.

	Experimente ohne S9		Experimente mit S9	
Bis-GMA ($\mu\text{Mol/L}$)	PE1	Mutantenrate ($\times 10^{-6}$)	PE1	Mutantenrate ($\times 10^{-6}$)
0	100	5	100	16
25	69	1	89	10
50	64	1	97	7
75	36	2	88	4
positive Kontrolle		183		362

3.2 Das Basismonomer Urethandimethacrylat (UDMA) im V79/HPRT-Test

Wurden die V79-Zellen 24 Stunden mit Urethandimethacrylat (UDMA) behandelt, so sanken bei einer Konzentration von 75 $\mu\text{Mol/L}$ die Gesamtzahl überlebender Zellen auf etwa 15% und die Überlebensraten (PE1) auf etwa 30% verglichen mit unbehandelten Kulturen. Auch das Basismonomer UDMA war, wie das Bis-GMA, nicht mutagen; es induzierte keine höheren 6-TG resistenten Zellklone und keine höheren Mutantenraten im angegebenen Konzentrationsbereich (Tabelle 15). Nach einer kurzen direkten Exposition von nur 4 Stunden waren die Überlebensraten der V79-Zellen etwa so hoch wie nach der längeren Behandlung von 24 Stunden. Auch in Gegenwart einer S9-Fraktion wurden keine höheren Zahlen 6-TG resistenter Zellklone beobachtet, UDMA wurde nicht zum Mutagen in V79-Zellen aktiviert (Tabelle 16).

Tabelle 15: Urethandimethacrylat (UDMA) im HPRT-Test (V79B-Zellen) nach direkter Exposition für 24 h. V79B-Zellen wurden mit steigenden UDMA-Konzentrationen behandelt. Überlebensraten und Mutantenraten sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten, die ohne S9-Fraktion durchgeführt wurden. Als positive Kontrollsubstanz wurde Methansulfonsäureethylester (EMS) verwendet.

UDMA ($\mu\text{Mol/L}$)	Zellzahl (%)	PE1 (%)	PE2 (%)	Mutantenrate ($\times 10^{-6}$)
0	100	100	100	8
25	69	116	100	10
50	36	123	111	6
75	15	29	111	10
EMS (200 $\mu\text{g/ml}$)				635

Tabelle 16: Urethandimethacrylat (UDMA) im HPRT-Test (V79B-Zellen) nach 4 h Exposition mit und ohne S9-Fraktion (10%).

Als positive Kontrollsubstanzen wurden Methansulfonsäureethylester (EMS, 200 µg/ml) in den Ansätzen ohne S9-Fraktion und 9-10-Dimethyl-1,2-Benzanthracen (DMBA, 30 µg/ml) in Versuchen mit S9-Fraktion verwendet.

	Experimente ohne S9		Experimente mit S9	
UDMA (µMol/L)	PE1	Mutantenrate (x 10 ⁻⁶)	PE1	Mutantenrate (x 10 ⁻⁶)
0	100	6	100	10
25	88	3	98	9
50	74	2	89	7
75			87	10
positive Kontrolle		123		533

3.3 Methylmethacrylat im V79/HPRT-Test

Das Monomer Methylmethacrylat (MMA) verringerte für die gegebenen Konzentrationen im V79/HPRT-Test nach einer direkten Exposition von 24 Stunden die Überlebensraten (*plating efficiencies*, PE1) der V79-Zellen kaum (Tabelle 17). Die Gesamtzellzahl in den behandelten Kulturen lag jedoch mit etwa 50% deutlich unter derjenigen unbehandelter Kulturen; bei noch höheren als den hier gezeigten MMA-Konzentrationen war die Zahl überlebender Zellen so gering, daß eine weitere Kultivierung als nicht sinnvoll erachtet wurde (nicht dargestellt). Es wurde ein leichter Anstieg der absoluten Zahl MMA-induzierter Mutanten beobachtet. Die mit 10 und 20 mMol/L MMA induzierten Mutantenraten lagen reproduzierbar und dosisabhängig etwas über der spontanen Mutantenrate (Tabelle 17). Methylmethacrylat ist also in diesem Konzentrationsbereich in V79-Zellen ein schwaches Mutagen. Diese Tendenz wurde in Anwesenheit einer S9-Fraktion nicht beobachtet (Tabelle 18).

Tabelle 17: Methylmethacrylat (MMA) im HPRT-Test (V79B-Zellen) nach direkter Exposition für 24 h.

V79B-Zellen wurden mit steigenden MMA-Konzentrationen behandelt. Überlebensraten und Mutantenraten sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten, die ohne S9-Fraktion durchgeführt wurden. Als positive Kontrollsubstanz wurde Methansulfonsäureethylester (EMS) verwendet.

MMA (mMol/L)	Zellzahl (%)	PE1 (%)	PE2 (%)	Mutantenrate (x 10 ⁻⁶)
0	100	100	100	3
10	71	99	109	6
20	49	97	104	16
EMS (200 µg/ml)			97	700

Tabelle 18: Methylmethacrylat (MMA) im HPRT-Test (V79B-Zellen) nach 4 h Exposition mit und ohne S9-Fraktion (10%).

Als positive Kontrollsubstanzen wurde Methansulfonsäureethylester (EMS, 200 µg/ml) in den Ansätzen ohne S9-Fraktion und 9-10-Dimethyl-1,2-Benzanthracen (DMBA, 30 µg/ml) in Versuchen mit S9-Fraktion verwendet. * Aufgrund der hohen Toxizität in den Zellkulturen wurde keine PE1 bestimmt, die PE2 allerdings lag bei 64%.

	Experimente ohne S9		Experimente mit S9	
MMA (mMol/L)	PE1	Mutantenrate (x 10 ⁻⁶)	PE1	Mutantenrate (x 10 ⁻⁶)
0	100	2	100	2
5			106	7
10	87	4	87	4
20	84	1	*	5
30	80	9		
positive Kontrolle		100		546

3.4 2-Hydroxyethylmethacrylat im V79/HPRT-Test

Das Monomer 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) verringerte die absolute Zahl überlebender Zellen bei einer Konzentration mit 5 mMol/L auf etwa 35% nach einer direkter Exposition für 24 Stunden. Überraschenderweise waren die Überlebensraten (*plating efficiencies*, PE1) der V79-Zellen deutlich höher (Tabelle 19). Noch höhere HEMA-Konzentrationen ließen keine Zellkolonien (PE1) überleben, aufgrund der wenigen Zellen in den experimentellen Ansätzen war eine sinnvolle Bestimmung von Mutantenraten nicht möglich (nicht gezeigt). HEMA war im Konzentrationsbereich von 0 - 5 mMol/L in V79-Zellen nicht mutagen. Es wurde kein Anstieg der absoluten Zahl HEMA-induzierter Mutanten beobachtet und keine im Vergleich zur spontanen Mutantenrate gestiegene Mutantenhäufigkeit errechnet (Tabelle 19). HEMA wurde nach kurzer Expositionszeit (4 Stunden) auch in Anwesenheit einer Mikrosomenfraktion nicht zum Mutagen aktiviert (Tabelle 20).

Tabelle 19: 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) im HPRT-Test (V79B-Zellen) nach direkter Exposition für 24 h.
V79B-Zellen wurden mit steigenden HEMA-Konzentrationen behandelt. Überlebensraten und Mutantenraten sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten, die ohne S9-Fraktion durchgeführt wurden. Als positive Kontrollsubstanz wurde Methansulfonsäureethylester (EMS) verwendet.

HEMA (mMol/L)	Zellzahl (%)	PE1 (%)	PE2 (%)	Mutantenrate (x 10 ⁻⁶)
0	100	100	100	2
1	108	81	83	7
2,5	75	113	98	2
5	35	84	97	5
EMS (200 µg/ml)			103	593

Tabelle 20: 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) im HPRT-Test (V79B-Zellen) nach 4 h Exposition mit und ohne S9-Fraktion (10%).

Als positive Kontrollsubstanzen wurden Methansulfonsäureethylester (EMS, 200 µg/ml) in den Ansätzen ohne S9-Fraktion und 9-10-Dimethyl-1,2-Benzanthracen (DMBA, 30 µg/ml) in Versuchen mit S9-Fraktion verwendet.

	Experimente ohne S9		Experimente mit S9	
HEMA (mMol/L)	PE1	Mutantenrate (x 10 ⁻⁶)	PE1	Mutantenrate (x 10 ⁻⁶)
0	100	12	100	18
1	105	14	106	25
2,5	109	8	106	5
5	95	15	99	26
positive Kontrolle		206		216

3.5 Bisphenol A im V79/HPRT-Test

Nach einer 24-stündigen direkten Exposition reduzierten bereits 0,2 mMol/L Bisphenol A (BPA) die Überlebensraten (PE1) auf fast 10% im Vergleich zu unbehandelten Kulturen, die Toxizität zum Zeitpunkt der Mutantenselektion (PE2) war jedoch deutlich geringer (Tabelle 21). Bisphenol A war in V79-Zellen in diesem Konzentrationsbereich nicht mutagen. Es induzierte keinen Anstieg der Zahl 6-TG resistenter Zellklone, die Mutantenraten behandelter Kulturen waren nicht höher als die spontane Mutantenrate (Tabelle 21). Bisphenol A war auch nach kurzer Exposition von 4 Stunden in V79-Zellen nicht direkt mutagen, es wurde in Anwesenheit einer S9-Fraktion nicht zum Mutagen aktiviert. Die Überlebensraten der Zellkulturen waren nach kurzer Behandlungsdauer höher als nach 24-stündiger Exposition (Tabelle 22).

Tabelle 21: Bisphenol A (BPA) im HPRT-Test (V79B-Zellen) nach direkter Exposition für 24 h. V79B-Zellen wurden mit steigenden BPA-Konzentrationen behandelt. Überlebensraten und Mutantenraten sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten, die ohne S9-Fraktion durchgeführt wurden. Als positive Kontrollsubstanz wurde Methansulfonsäureethylester (EMS) verwendet.

BPA (mMol/L)	Zellzahl (%)	PE1 (%)	PE2 (%)	Mutantenrate (x 10 ⁻⁶)
0	100	100	100	2
0,1	77	96	84	2
0,2	21	12	87	4
EMS (200 µg/ml)			94	485

Tabelle 22: Bisphenol A (BPA) im HPRT-Test (V79B-Zellen) nach 4 h Exposition mit und ohne S9-Fraktion (10%).

Als positive Kontrollsubstanzen wurden Methansulfonsäureethylester (EMS, 200 µg/ml) in den Ansätzen ohne S9-Fraktion und 9-10-Dimethyl-1,2-Benzanthracen (DMBA, 30 µg/ml) in Versuchen mit S9-Fraktion verwendet.

	Experimente ohne S9		Experimente mit S9	
BPA (mMol/L)	PE1	Mutantenrate (x 10 ⁻⁶)	PE1	Mutantenrate (x 10 ⁻⁶)
0	100	5	100	8
0,1	90	6		
0,2	80	4	98	5
0,3			97	2
positive Kontrolle		466		343

3.6 Glycidylmethacrylat im V79/HPRT-Test

Das Glycidylmethacrylat (GMA) reduzierte nach einer Behandlungszeit von 24 Stunden und direkter Exposition die Überlebensraten (*plating efficiencies*, PE1) der V79-Zellen mit einer Konzentration von 0,2 mMol/L auf weniger als 10% im Vergleich zu unbehandelten Kulturen (Tabelle 23). Allerdings blieb die Zahl der koloniebildenden Zellen in den behandelten Kulturen zu Beginn der Selektionsphase (PE2) fast so hoch wie in den Kontrollkulturen. GMA war in V79-Zellen mutagen, die Zahl der 6-TG resistenten Zellklone stieg mit steigenden GMA-Konzentrationen deutlich an. GMA-Konzentrationen von 0,1 mMol/L und 0,2 mMol/L induzierten Mutantenraten, die etwa 7-fach und fast 20-fach über der spontanen Mutantenrate lagen (Tabelle 23). GMA war auch nach einer kurzen Exposition von nur 4 Stunden in V79-Zellen direkt mutagen, die Mutantenraten lagen allerdings unter denjenigen, die nach 24-stündiger Exposition induziert wurden. Entsprechend waren die Überlebensraten der behandelten Zellkulturen nach kurzer Behandlungsdauer deutlich höher als nach 24-stündiger Exposition. Toxische und mutagene Wirkungen des GMA in V79-Zellen wurden in Anwesenheit einer S9-Fraktion aufgehoben (Tabelle 24).

Tabelle 23: Glycidylmethacrylat (GMA) im HPRT-Test (V79B-Zellen) nach direkter Exposition für 24 h.

V79B-Zellen wurden mit steigenden GMA-Konzentrationen behandelt. Überlebensraten und Mutantenraten sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten, die ohne S9-Fraktion durchgeführt wurden. Als positive Kontrollsubstanz wurde Methansulfonsäureethylester (EMS) verwendet.

GMA (mMol/L)	Zellzahl (%)	PE1 (%)	PE2 (%)	Mutantenrate (x 10 ⁻⁶)
0	100	100	100	10
0,1	59	93	88	65
0,2	11	5	92	183
EMS (200 µg/ml)			80	809

Tabelle 24: Glycidylmethacrylat (GMA) im HPRT-Test (V79B-Zellen) nach 4 h Exposition mit und ohne S9-Fraktion (10%).

Als positive Kontrollsubstanzen wurden Methansulfonsäureethylester (EMS, 200 µg/ml) in den Ansätzen ohne S9-Fraktion und 9-10-Dimethyl-1,2-Benzanthracen (DMBA, 30 µg/ml) in Versuchen mit S9-Fraktion verwendet.

	Experimente ohne S9		Experimente mit S9	
GMA (mMol/L)	PE1	Mutantenrate (x 10 ⁻⁶)	PE1	Mutantenrate (x 10 ⁻⁶)
0	100	5	100	10
0,2	89	18	103	5
0,3	61	43	117	11
positive Kontrolle		239		399

3.7 Das Comonomer Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) im V79/HPRT-Test

Das in Kompositen als Comonomer verwendete Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) verringerte nach einer direkten Exposition von 24 Stunden die Überlebensraten (*plating efficiencies*, PE1) der V79-Zellen mit steigenden Konzentrationen. Mit 0,5 mMol/L TEGDMA lagen die Überlebensraten behandelter Zellkulturen bei etwa 40%, mit 1.0 mMol/L bei weniger als 10% im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Tabelle 25). Die Überlebensraten zu Beginn der Selektionsphase (PE2) waren für TEGDMA-exponierte Zellen fast so hoch wie in den Kontrollkulturen. TEGDMA war in V79-Zellen direkt mutagen. Die Zahl 6-TG resistenter Zellklone stieg dosisabhängig: 0,5 mMol/L und 1,0 mMol/L TEGDMA induzierten Mutantenraten, die etwa 10- und fast 20-fach über der spontanen Mutantenfrequenz unbehandelter Zellkulturen lagen (Tabelle 25). TEGDMA war auch nach einer nur 4-stündigen Exposition in V79-Zellen direkt mutagen. Eine S9-Fraktion reduzierte die mutagene Wirkung des TEGDMA in den hier geprüften Konzentrationen jedoch deutlich (Tabelle 26).

Tabelle 25: Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) im HPRT-Test (V79B-Zellen) nach direkter Exposition für 24 h.

V79B-Zellen wurden mit steigenden TEGDMA-Konzentrationen behandelt. Überlebensraten und Mutantenraten sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten, die ohne S9-Fraktion durchgeführt wurden. Als positive Kontrollsubstanz wurde Methansulfon-säureethylester (EMS) verwendet.

TEGDMA (mMol/L)	Zellzahl (%)	PE1 (%)	PE2 (%)	Mutantenrate (x 10 ⁻⁶)
0	100	100	100	8
0,5	82	40	91	87
1,0	13	3	88	138
EMS (200 µg/ml)			79	854

Tabelle 26: Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) im HPRT-Test (V79B-Zellen) nach 4 h Exposition mit und ohne S9-Fraktion (10%).

Als positive Kontrollsubstanzen wurden Methansulfonsäureethylester (EMS, 200 µg/ml) in den Ansätzen ohne S9-Fraktion und 9-10-Dimethyl-1,2-Benzanthracen (DMBA, 30 µg/ml) in Versuchen mit S9-Fraktion verwendet.

	Experimente ohne S9		Experimente mit S9	
TEGDMA (mMol/L)	PE1	Mutantenrate (x 10 ⁻⁶)	PE1	Mutantenrate (x 10 ⁻⁶)
0	100	2	100	7
0,5	70	14	126	2
1,0	60	89	82	13
positive Kontrolle		197		296

4 Vergleichende Diskussion der Mutagenität und Genotoxizität von Monomeren zahnärztlicher Komposite

Die Prüfung der Mutagenität zahnärztlicher Werkstoffe sollte, ähnlich wie die anderer Umweltchemikalien, dem heutigen Stand der wissenschaftlichen Argumentation zufolge mit verschiedenen *in vitro* Verfahrenen begonnen werden. Diese Verfahren sollten wegen der unterschiedlichen Wirkungsweisen chemischer Substanzklassen verschiedene Typen von Mutationen erfassen (Genmutationen, Chromosomenaberrationen, Genommutationen) und mit Organismen verschiedener phylogenetischer Organisationshöhe durchgeführt werden (OECD, 1993; Fahrig, 1993). Die Prüfung fremdstoffinduzierter Genmutationen werden in der Regel *in vitro* mit Bakterien, hauptsächlich mit *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium*, aber auch mit verschiedenen Säugetierzelllinien, etwa V79-Zellen, durchgeführt (Fahrig, 1993). In der vorliegenden Arbeit wurden mit dem Ames-Test und dem V79/HPRT-Test verschiedene Monomere zahnärztlicher Komposite geprüft.

Die spontanen Reversionsraten der vier *S. typhimurium*-Stämme im Ames-Test lagen im Bereich der historischen Daten unseres Labors; diese waren mit S9 in der Regel höher als ohne Mikrosomenfraktion. Die spontane Mutantenrate der V79B-Wildtyp-Zelllinie variierte in den hier vorgestellten Versuchen in den Ansätzen ohne S9-Fraktion zwischen 2 und 12 Mutanten pro 10^6 koloniebildender Zellen. Diese Streuung lag damit etwas außerhalb der Grenzen, die mit 2-4 Mutanten pro 10^6 überlebenden Zellen angegeben wurden (Helbig, 1995). Andererseits sind Variationen spontaner Mutantenraten der V79-Wildtyp-Zellen selbst unter identischen Kulturbedingungen bekannt (Glatt, 1994). Wichtig war hier, daß für die Substanzen Glycidylmethacrylat und Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) dosisabhängige erhöhte Mutantenraten in den Ansätzen ohne metabolische Aktivierung durch eine Mikrosomenfraktion (S9) gemessen wurden. Auffällig war, ähnlich wie auch im Ames-Test zu beobachten, die erhöhte spontane Mutantenrate der V79-Zellen in Anwesenheit einer S9-Fraktion.

Möglicherweise wurde diese erhöhte Mutantenrate durch giftige Stoffwechselprodukte der Mikrosomenfraktion verursacht (Glatt, 1994).

Acrylat- und Methacrylatester, zu der die hier geprüften Kompositmonomere Bis-GMA, UDMA, TEGDMA, Methylmethacrylat (MMA) und 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) gehören, werden in der gesamten Polymerchemie vielfach verwendet (IARC, 1979). Wegen der weiten Verbreitung dieser Substanzen und ihrer Produktion in großem Maßstab sind Produzenten, Verbraucher und Umwelt häufig diesen Substanzen exponiert. Gemessen an der Vielfalt der Substanzen liegen allerdings erstaunlich wenige Daten zur Genotoxizität in der verfügbaren Literatur vor.

Erste Untersuchungen fanden in der großen Mehrzahl keine mutagenen Effekte von Acrylaten und Methacrylaten im Ames-Test (Waegemaekers und Bensink, 1984; Zeiger *et al.*, 1987). Der Anschein, diese Substanzen würden keine Genmutationen induzieren, wurde in nachfolgenden Untersuchungen, die mit Säugetierzellen durchgeführt wurden, jedoch nicht bestätigt. Mehrere Acrylate waren im L5178Y/TK-Test mit Mauslymphomzellen positiv (Przybojewska *et al.*, 1984; NTP 1986; Andrews und Clary, 1986; Tennant *et al.*, 1987b). Monofunktionale Acrylat- und Methacrylatester induzierten in diesem Testsystem auch kleine Kolonien, die als Hinweis auf klastogene Effekte einer Prüfsubstanz diskutiert werden; zudem wurden substanzinduzierte Chromosomenaberrationen und Mikrokerne, die auf klastogene Effekte hinweisen, in den Lymphomzellen der Maus nachgewiesen (Moore *et al.*, 1988; Dearfield *et al.*, 1989).

Eine vergleichende Untersuchung zur Genotoxizität kleiner monofunktionaler und multifunktionaler Acrylate und der korrespondierenden Methacrylate ergab, daß die Acrylate wesentlich toxischer und auch wirksamer in der Induktion von Mutanten waren als die Methacrylate. So war Methylacrylat (22 µg/ml oder 268 µMol/L) um etwa zwei Größenordnungen wirksamer verglichen mit Methylmethacrylat (2799 µg/ml oder 27,99 mMol/L), Tetraethylenglycoldiacrylat (3 µg/ml oder 9,9 µMol/L) war wirksamer als Tetra-

ethylenglycoldimethacrylat (525 µg/ml oder 1,6 mMol/L) und das Trimethylolpropandiacrylat wirksamer als das zugehörige Dimethacrylat. Diesen Zahlen wurde auch entnommen, daß die Toxizität und die Fähigkeit, Mutanten zu induzieren, mit steigender Anzahl funktioneller Gruppen der Acrylate zunehmen. Eine funktionale Gruppe mehr erhöht die Wirksamkeit der Acrylate und der Methacrylate um eine Größenordnung. Die mutagenen Effekte dieser niedermolekularen Acrylate und Methacrylate wurden ohne metabolische Aktivierung (S9-Fraktion) gemessen (Dearfield *et al.*, 1989).

4.1 Die Basismonomere Bis-GMA und UDMA

Die Basismonomere Bis-GMA und UDMA waren in *S. typhimurium* und in V79-Zellen in den Experimenten mit und ohne S9-Fraktion nicht mutagen. Es fiel auf, daß in den Experimenten mit S9 die Zytotoxizität der Substanzen deutlich reduziert war. Diese Beobachtung wird unten im Zusammenhang mit der Diskussion der Mutagenität des TEGDMA genauer erörtert. Aufgrund der Daten zur Zytotoxizität beider Substanzen in V79-Zellen ist jedoch auszuschließen, daß die negativen Befunde bei direkter Prüfung auf zu niedrige Konzentrationen der Testsubstanzen in den behandelten V79-Kulturen zurückzuführen sind. Weder geringe noch hohe Konzentrationen der Substanzen induzierten nach langer (24 Stunden) und kurzer (4 Stunden) Expositionszeit mutagene Effekte.

Bis-GMA und UDMA waren in verschiedenen bakteriellen Testsystemen nicht genotoxisch und nicht mutagen. Selbst Konzentrationen, die um den Faktor 10-100 über den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten lagen, bewirkten keine erhöhten Mutationsraten in *S. typhimurium* TA100 oder im *umu*-Test (Geurtsen, 1988; Leyhausen *et al.*, 1995; Heil *et al.*, 1996). Ein Bis-GMA/TEGDMA-Polymer (50/50%) sowie die Einzelsubstanz UDMA induzierten nach Extraktion in DMSO in den *Salmonella*-Stämmen TA97a, TA98 und TA100 ebenfalls keine mutagenen Effekte (Yourtee *et al.*, 1994; Rose *et al.*, 1996).

Untersuchungen zur Mutagenität von Bis-GMA und UDMA in Säugetierzellen sind in der verfügbaren Literatur bisher nicht beschrieben. Es wurden jedoch in einer neueren Arbeit genotoxische Effekte beobachtet. In Konzentrationen, die etwas über den hier eingesetzten lagen, wurde Bis-GMA *in vitro* im *DNA synthesis inhibition test* (DIT) mit HeLa-Zellen als genotoxisch eingestuft. Andererseits war die Substanz in sehr viel höherer Konzentration (2 mMol/L) *in vivo* nicht genotoxisch (Heil *et al.*, 1996). Die Genotoxizität des UDMA wurde von derselben Arbeitsgruppe nach Untersuchungen mit dem *DNA synthesis inhibition test* in zwei Arbeiten etwas unterschiedlich beurteilt. Eine genotoxische Wirkung der Substanz *in vivo* konnte nicht ausgeschlossen werden (Leyhausen *et al.*, 1995; Heil *et al.*, 1996). Mit genotoxischen Befunden würde die oben diskutierte Wirkung des UDMA auf verschiedene Phasen des Zellzyklus korrelieren. UDMA induzierte geringe Modifizierungen des Zellzyklus in Säugetierzellen (Nassiri *et al.*, 1994). Es ist denkbar, daß UDMA DNA-Schäden in Säugetierzellen induzieren kann, die über intrazelluläre Signaltransduktionsketten Mechanismen anstoßen, die den Zellzyklus kurzzeitig arretieren und damit den zelleigenen DNA-Reparaturmechanismen erlauben, diese Schäden wieder zu eliminieren. Reparaturmechanismen, die, wahrscheinlich vermittelt über p53, DNA-Schäden beseitigen können, sind in der Literatur beschrieben (Marx, 1994; Smith *et al.*, 1994).

4.2 Die Monomere Methymethacrylat und 2-Hydroxyethylmethacrylat

Die Monomere Methymethacrylat (MMA) und 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) zeigten unterschiedliche mutagene Effekte in den V79-Zellen. MMA induzierte einen leichten Anstieg HPRT-defizienter Zellen; höhere MMA-Konzentrationen führten in mehreren Experimenten wahrscheinlich aufgrund der rapide ansteigenden Toxizität der Substanz zu keinen reproduzierbaren Mutantenhäufigkeiten. Für HEMA hingegen wurde in V79-Zellen bis in den toxischen Konzentrationsbereich hinein keine mutagene Wirkung nachgewiesen. Im Ames-Test induzierten beide Substanzen keine erhöhten Reversionsraten in den hier verwendeten *Salmonella*-Stämmen.

Die Beurteilung der Genotoxizität, Mutagenität und Karzinogenität von Methylmethacrylat (MMA) ergibt aufgrund unterschiedlicher Ergebnisse, die mit verschiedenen Prüfsystemen erzielt wurden, ein uneinheitliches Bild. Erste Untersuchungen berichteten von mutagenen Reaktionen in einem bakteriellen Mutagenitätstest mit *S. typhimurium* TM677 nach metabolischer Aktivierung (Poss *et al.*, 1979). Spätere Prüfungen mit anderen *in vitro* Testsystemen führten allerdings zu entgegengesetzter Interpretation. Mit dem Ames-Test (Platteninkorporationstest) wurde keine Mutagenität gefunden, vielmehr inhibierte MMA die Wirkung starker Mutagene und Kanzerogene (Waagaemakers und Bensink, 1984; Zeiger *et al.*, 1987; Chou *et al.*, 1996). Unsere eigenen Untersuchungen mit dem Ames-Test waren ebenfalls negativ (Schweikl *et al.*, 1994). Mutagenitätsprüfungen mit Säugetierzellen hingegen zeigten eine genotoxische Wirkung von Methylmethacrylat; es wurden eine erhöhte Rate an Schwesterchromatidaustauschen in humanen Zellen *in vivo* und chromosomale Schäden an Mauslymphomzellen beobachtet (Doerr *et al.*, 1989; Marez *et al.*, 1991). Methylmethacrylat induzierte in derselben Konzentration, die hier im V79/HPRT-Test zu einem leichten Anstieg der Mutantenhäufigkeit führte, eine erhöhte Mutantenfrequenz im L5178Y/TK-Test und Chromosomenaberrationen mit Mauslymphomzellen (Dearfield *et al.*, 1989; Doerr *et al.*, 1989). Die Substanz erhöhte ebenfalls die Häufigkeit von Chromosomenschäden *in vivo* nach einmaliger Applikation hoher Konzentrationen (Chan *et al.*, 1994).

Die Literatur enthält auch Berichte über die tumorogene Wirkung von MMA, die in ihren Ergebnissen differieren. So schädigte Methylmethacrylat zwar die Nasenschleimhaut von Ratten und Mäusen in Inhalationsexperimenten, löste aber unter diesen Bedingungen kein dosisabhängiges Wachstum von Tumoren aus. Ganz im Gegenteil schien es die Häufigkeit einiger Tumortypen zu reduzieren (Chan *et al.*, 1988). Andererseits wurde berichtet, daß polymerisiertes Methylmethacrylat das Wachstum von Tumoren nach subkutaner Implantation induzierte. Die Substanz wirkte jedoch nicht tumorogen auf der Haut (Oppenheimer *et al.*, 1955).

Für Methylmethacrylat und Methylether wurden teratogene Effekte beobachtet, Methylmethacrylat verursachte allerdings keine Mißbildungen des Skelettes (Singh *et al.*, 1972).

Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) wurde in sämtlichen bisher veröffentlichten Arbeiten nicht als genotoxisch oder mutagen beschrieben. HEMA induzierte keine erhöhten Mutationsraten in vier verschiedenen *S. typhimurium* -Stämmen im Ames-Test und keine Mutationen im *umu*-Test (Schweikl *et al.*, 1994; Heil *et al.*, 1996). Vergleichbar mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit war HEMA in HeLa-Zellen auch in Konzentrationen, die weit über dem hier bestimmten TC50-Wert lagen, nicht genotoxisch (Heil *et al.*, 1996). Im Unterschied zu HEMA induzierte das 2-Hydroxyethylacrylat einen deutlichen Anstieg von Mutanten im L5178Y/TK-Test mit Mauslymphomzellen, einen dosisabhängigen Anstieg von Chromosomenaberrationen und eine gestiegene Häufigkeit von Mikronuklei (Dearfield *et al.*, 1989). Auch diese Resultate stützen die Hypothese von der weitaus größeren Wirksamkeit der Acrylate verglichen mit den entsprechenden Methacrylaten (Dearfield *et al.*, 1989).

4.3 Bisphenol A

Für das Bisphenol A wurde hier im Ames-Test und im V79/HPRT-Test sowohl mit als auch ohne S9-Fraktion keine Mutagenität beobachtet. Diese Ergebnisse stimmen mit den bisher verfügbaren Literaturangaben überein. Kurzzeittests *in vitro* zeigten keine Induktion von Genmutationen in *Salmonella typhimurium*, keine Induktion von Mutationen im L5178Y/TK-Test in Mauslymphomzellen und keine Chromosomenaberrationen in CHO-Zellen (Tennant *et al.*, 1987a; Ashby und Tennant, 1988). Allerdings wurden kürzlich Mikrokerne in V79-Zellen nach Behandlung mit Bisphenol A nachgewiesen (Pfeiffer *et al.*, 1997). Möglicherweise induzierte BPA auch Schwesterchromatidaustausche in CHO-Zellen. Die Kanzerogenität des BPA in männlichen Ratten ist nicht zweifelsfrei erwiesen und es gibt lediglich Anhaltspunkte für eine kanzerogene Wirkung der Substanz in Organen des blutbildenden Systems weiblicher Ratten

sowie männlicher und weiblicher Mäuse (Tennant *et al.*, 1987a; Ashby und Tennant, 1988; Ivet *et al.*, 1989).

Das Bisphenol A kann über hochreaktive Zwischenprodukte *in vitro* und *in vivo* DNA-Addukte bilden. Dabei wird Bisphenol A zunächst enzymatisch hydroxyliert, dann entsteht über ein Semiquinon das 4,5-Bisphenol O-Quinon. Erst das Bisphenol O-Quinon bindet kovalent an DNA. In Abwesenheit einer Mikrosomenfraktion oder in Anwesenheit von Inhibitoren der Aktivität von P450-Cytochromen und der assoziierten Reduktase wurden *in vitro* keine DNA-Addukte gebildet (Atkinson und Roy, 1995a; Atkinson und Roy, 1995b).

4.4 Glycidylmethacrylat

Glycidylmethacrylat ist ein Epoximethylacrylat und gehört deshalb chemisch zur Klasse aliphatischer Epoxide. Man unterscheidet hier zwischen nicht-substituierten aliphatischen Epoxiden, halogenierten aliphatischen Epoxiden, Glycidylestern, Glycidylethern und Diglycidylethern (Canter *et al.*, 1986). Epoxide sind alkylierende Substanzen, genotoxische Effekte *in vivo* und die Beurteilung des Gefährdungspotentials von Epoxiden waren deshalb aufgrund ihrer vielfältigen Verwendung in der chemischen Industrie früh von Interesse (Ehrenberg und Hussain, 1981).

Aliphatische Epoxide waren in *Salmonella typhimurium* TA100 und TA1535, aber auch TA97, direkt mutagen (Wade *et al.*, 1978; Simmon 1979; De Flora, 1981; Canter *et al.*, 1986; Sinsheimer *et al.*, 1993). Das mutagene Potential der Epoxide wurde mit der Elektronegativität der Substituenten, die der Epoxidgruppe direkt benachbart sind, korreliert (Hemminki und Falck, 1979; Voogd *et al.*, 1981). Die Alkylierungsraten der DNA durch die einzelnen Epoxide korrelierten wiederum mit der Wirksamkeit der Substanzen im Genmutationstest mit *E. coli* WP2 (Hemminki *et al.*, 1980). Die Substanzen reagierten kovalent mit der DNA und die DNA-Addukte konnten isoliert werden. Aliphatische Epoxide sind auch in Säugetierzellen genotoxisch. Sie

induzierten Chromosomenaberrationen *in vitro* und *in vivo*, periphere Lymphozyten exponierter Arbeiter wiesen erhöhte Raten von Schwesterchromatidaustauschen auf (Lerda und Rizzi, 1992; Das *et al.*, 1993). Für das Glycidylmethacrylat im besonderen liegen allerdings nur wenige Befunde zur Genotoxizität vor. GMA wirkte in *Salmonella typhimurium* TA97, TA100 und TA 1535, jedoch nicht in TA98, direkt mutagen. Der mutagene Effekt wurde übereinstimmend mit den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen auch in Anwesenheit einer metabolisch aktiven Mikrosomenfraktion beobachtet (Canter *et al.*, 1986). Wie für aliphatische Epoxide im allgemeinen nachgewiesen, bindet auch Glycidylmethacrylat wahrscheinlich kovalent an DNA und bildet DNA-Addukte. Die Substanz induzierte eine außerplanmäßige DNA-Synthese (UDS) in Lymphozyten des Menschen und der Ratte, nach Exposition *in vivo* war die Häufigkeit geschädigter Spermien in männlichen Mäusen erhöht und die Spermienzahl deutlich reduziert (Xie *et al.*, 1990). Angaben zur Mutagenität der Substanz in Säugetierzellen lagen in der verfügbaren Literatur nicht vor.

Das Glycidylmethacrylat induzierte in der vorliegenden Arbeit in *S. typhimurium* TA100 Mutantenzahlen, die bei direkter Prüfung etwa um den Faktor 8 über der Zahl spontaner Mutanten lagen. In den Experimenten mit S9 stiegen die Mutantenzahlen sogar noch mehr. Die GMA-induzierten Mutantenzahlen der Stämme TA102 und TA97a lagen lediglich etwa um den Faktor 2-3 über der Zahl spontaner Revertanten. Man darf daher annehmen, daß GMA überwiegend Basenpaarsubstitutionen (TA100 und TA102) induzierte und wahrscheinlich nur aufgrund seiner hohen Reaktivität zum kleineren Teil *frameshift*-Mutationen (TA97a). Die höheren GMA-induzierten Revertanten im Stamm TA100 verglichen mit TA102 und die geringe Mutagenität in TA97a lassen vermuten, daß GMA bevorzugt an Guaninbasen reagierte. Im Unterschied zu den Ergebnissen im Ames-Test wurde in den Säugetierzellen (V79/HPRT-Test) ein dosisabhängiger Anstieg GMA-induzierter Mutanten etwa um den Faktor 10 nur bei direkter Prüfung gefunden. In Gegenwart einer S9-Fraktion war die Mutantenhäufigkeit deutlich reduziert.

Wie lassen sich diese Unterschiede in der mutagenen Aktivität des GMA in den beiden verschiedenen Testsystemen diskutieren? Glycidylmethacrylat ist ein Glycidylester mit dem für die Substanzklasse typischen (2,3-Epoxypropyl)-Rest als einer funktionalen Gruppe. Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten ist ein ähnlicher Mechanismus der mutagenen Wirkung der Substanz denkbar, wie er für den Bisphenol A-Diglycidylether (BADGE) diskutiert wurde. Diese Substanz kommt neben vielen anderen Anwendungen als Epoxidharz in der Polymerchemie vor, und ist als Flüssigkeit (Harz) auch Bestandteil eines zahnärztlichen Wurzelkanalfüllungsmaterials (AH26). Dieses Material war in *Salmonella typhimurium* TA100 und in V79-Zellen direkt mutagen (Schweikl und Schmalz, 1991; Schweikl *et al.*, 1995).

Es ist bekannt, daß Bisphenol A-Diglycidylether kovalent an DNA bindet, weil Desoxyadenin-Addukte nach Exposition *in vivo* nachgewiesen wurden (Steiner *et al.*, 1992; Vanhoutte *et al.*, 1995). Zudem korrelierten die DNA-alkylierenden Eigenschaften des BADGE mit seiner Mutagenität (Andersen *et al.*, 1978; Wade *et al.*, 1979; Hemminki *et al.*, 1980; Canter *et al.*, 1986). Die DNA-Addukte resultieren wahrscheinlich aus einem der zwei bekannten Stoffwechselwege für das BADGE. Zum einen wird BADGE durch das Monooxygenasesystem direkt dealkyliert, woraus Glycidaldehyd entsteht. Diese Substanz bindet an DNA. Wird BADGE jedoch alternativ dazu durch eine Epoxidhydrolase zum Diol reduziert, erhält man nach oxidativer Dealkylierung durch Monooxygenasen einen Alkohol und Glycerinaldehyd (Bentley *et al.*, 1989). Beide Substanzen bilden keine DNA-Addukte (Climie *et al.*, 1981). Wahrscheinlich wird BADGE durch diese beiden konkurrierenden enzymatischen Reaktionen bei niedrigen Konzentrationen durch Epoxidhydrolasen metabolisch inaktiviert, bei hohen Konzentrationen aber nach O-Dealkylierung aktiviert (Bentley *et al.*, 1989).

Ähnliche Mechanismen würden teilweise auch die hier beschriebenen Unterschiede der mutagenen Aktivitäten des Glycidylmethacrylats im Ames-Test und im V79/HPRT-Test in Anwesenheit einer S9-Fraktion erklären. Es ist denkbar, daß das Glycidylmethacrylat im Ames-Test zunächst von einer membrangebundenen mikrosomalen Esteraseaktivität hydrolytisch zu

Methacrylsäure und Glycidol gespalten wird (Abb. 3). Das Glycidol wurde in *S. typhimurium* TA100 in Ansätzen mit und ohne S9-Fraktion als mutagen beschrieben (Canter *et al.*, 1986). So ließen sich in der vorliegenden Arbeit auch die höheren Revertantenzahlen vor allem des *Salmonella*-Stammes TA100 in Anwesenheit von S9 in den Experimenten mit Glycidylmethacrylat erklären. Man kann annehmen, daß Glycidol diese Reaktionen induzierte. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß GMA nur zu einem Teil metabolisiert wurde und dann zwei Substanzen, das GMA und das Glycidol, aktiv waren. Auch im V79/HPRT-Test wurde das Glycidylmethacrylat wahrscheinlich zunächst durch eine Esteraseaktivität in Glycidol und Methacrylsäure gespalten. Im Unterschied zum Ames-Test wurden die V79-Zellen im HPRT-Test jedoch 4 Stunden in Anwesenheit von S9 mit Glycidylmethacrylat behandelt. In dieser Zeit könnte selbst eine geringe Epoxidhydrolase-Aktivität in einer nachgelagerten Reaktion das mutagene Glycidol zum inaktiven Glycerin reduzieren (Abb. 3). Im Ames-Test wurde das Glycidylmethacrylat nur sehr kurz mit der S9-Fraktion gemischt. Möglicherweise wurde das Glycidol deshalb nicht zu Glycerin reduziert.

Neben den unterschiedlich langen Inkubationszeiten im Ames-Test und im HPRT-Test, während denen Enzyme der Mikrosomenfraktion in verschiedener Weise wirksam sein könnten, wurde die Aktivität der Epoxidhydrolase möglicherweise durch die verschiedenen GMA-Konzentrationen im Ames-Test und im HPRT-Test modifiziert. Die Glycidolkonzentration oder die Konzentration des Glycidylmethacrylats könnten in den Ansätzen des Ames-Tests so hoch gewesen sein, daß die Epoxidhydrolase-Aktivität inhibiert wurde und folglich die Epoxidgruppe nicht reduziert wurde. Die Glycidylmethacrylat-Konzentrationen in den Ansätzen mit und ohne Topagar vor dem Ausgießen auf Agarplatten lagen etwa zwischen 130 mMol/L und 400 mMol/L und somit 2 bis 3 Größenordnungen über der GMA-Konzentration im V79/HPRT-Test. Umgekehrt könnte die vergleichsweise geringe GMA-Konzentration im V79/HPRT-Test die Aktivität einer Epoxidhydrolase gefördert haben. Ein ähnlicher Mechanismus wurde oben für die Wirkung des BADGE diskutiert (Bentley *et al.*, 1989). Das Glycidol wäre dann zu Glycerol

(Glycerin) reduziert worden, eine Substanz, für die in der verfügbaren Literatur keine mutagenen Effekte beschrieben sind.

Die Enzymaktivitäten, die hier die Wirkungsweisen des GMA in den beiden Genmutationstests erklären könnten, werden in der folgenden Diskussion des Mechanismus der mutagenen Aktivität des TEGDMA nochmals aufgegriffen und genauer beschrieben. Vor allem wird dort auf die Bedeutung einer mikrosomalen Esteraseaktivität einzugehen sein.

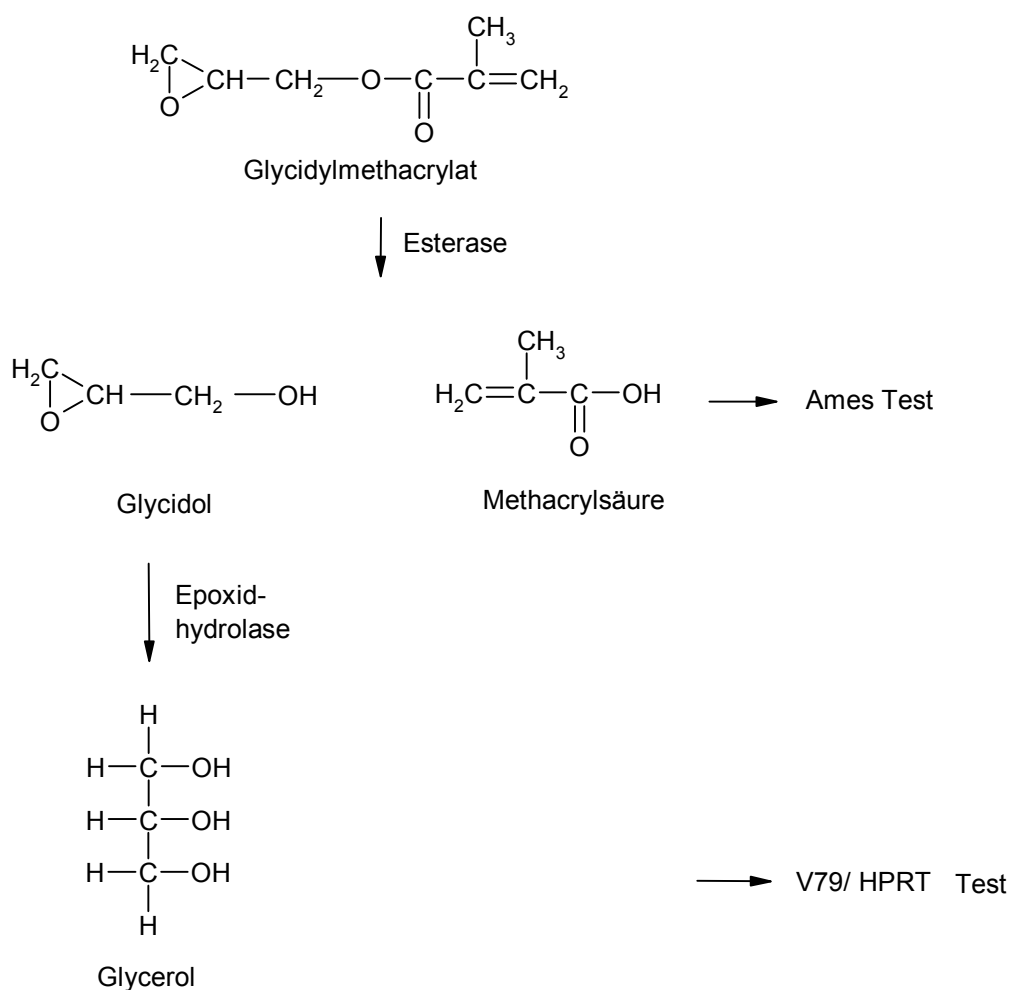


Abb. 3: Enzymatische Reaktionen am GMA im Ames-Test und im V79/HPRT-Test.

Wahrscheinlich war, wie bisher diskutiert, nur die Epoxidgruppe die funktionale Gruppe des Glycidylmethacrylats im Ames-Test und im V79/HPRT-Test, nicht jedoch die Methacrylatgruppe. Mehrere Gründe führten zu dieser Vermutung. Die bekannte Literatur und die hier erzielten Ergebnisse wiesen auf keine Mutagenität der Acrylate und der Methacrylate im Ames-Test hin (Cameron *et al.*, 1991). Glycidylmethacrylat war andererseits hier im Ames-Test und im V79/HPRT-Test bei direkter Prüfung mutagen. Monofunktionale Acrylate und Methacrylate waren zwar in Säugetierzellen mutagen, allerdings bei höheren Konzentrationen als das Glycidylmethacrylat in der vorliegenden Arbeit (Dearfield *et al.*, 1989). Vor allem aber ist, wie oben ausführlich dargestellt, die Mutagenität aliphatischer Glycidylverbindungen gut dokumentiert. Die Diskussion der Mechanismen der mutagenen Wirkung von Methacrylaten wird im Kapitel zur Mutagenität des TEGDMA ausführlich aufgegriffen.

4.5 Das Comonomer Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA)

Die Mutagenität oder Genotoxizität des Comonomers TEGDMA ist in der zugänglichen Literatur bisher nicht beschrieben. TEGDMA war in der vorliegenden Arbeit im Ames-Test und im V79/HPRT-Test unterschiedlich wirksam. Die Substanz ist im Ames-Test nicht, im HPRT-Test allerdings bei direkter Prüfung mutagen. Ein dosisabhängiger Anstieg TEGDMA-induzierter HPRT-Mutanten bei direkter Prüfung wurde durch die metabolische Aktivität einer Mikrosomenfraktion (S9-Fraktion) deutlich reduziert.

Das Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) wird zwar am häufigsten als Comonomer zahnärztlicher Komposite verwendet, es ist allerdings nur ein Derivat aliphatischer Dimethacrylate, die für diese Funktion geeignet sind (Viol *et al.*, 1986). Für die Derivate Ethylenglycoldimethacrylat (EGDMA), das Diethylenglycoldimethacrylat (DEGDMA) und das Tetraethylenglycoldimethacrylat (TETGDMA) sind wenige Daten zur Genotoxizität und Mutagenität publiziert. Wie das hier geprüfte TEGDMA, war auch das Ethylenglycoldimethacrylat (EGDMA) in *Salmonella typhimurium* nicht mutagen. EGDMA induzierte im L5178Y/TK-Test mit Mauslymphomzellen bei einer verglichen mit den wirksamen

Konzentrationen des TEGDMA in V79-Zellen hohen Konzentration von etwa 5 mMol/L mutagene Effekte. Erstaunlicherweise wurden diese nur in Anwesenheit einer S9-Fraktion gemessen (Cameron *et al.*, 1991). Das Diethylenglycoldimethacrylat (DEGDMA) war bei hohen Konzentrationen (bis 20 mMol/L) im *umu*-Test nicht eindeutig genotoxisch und im *DNA synthesis inhibition test* (DIT) mit HeLa-Zellen wurde keine genotoxische Wirkung gemessen (Heil *et al.*, 1996). Das Tetraethylenglycoldimethacrylat hingegen war im L5178Y/TK-Test mutagen und induzierte Chromosomenaberrationen und Mikrokerne bei allerdings niedrigen Überlebensraten behandelter Zellen. Deshalb wurden klastogene Effekte der Acrylate und Methacrylate diskutiert (Moore *et al.*, 1988; Dearfield *et al.*, 1989). Die im Mauslymphomtest wirksame Konzentration des Tetraethylenglycoldimethacrylats lag nur geringfügig über der direkt wirksamen mutagenen Konzentration des Triethylenglycoldimethacrylats (TEGDMA) in der vorliegenden Arbeit, und die mutagenen Potentiale der beiden Substanzen waren in etwa gleich. Der direkte mutagene Effekt des TEGDMA in V79-Zellen wurde in Anwesenheit einer S9-Fraktion aufgehoben. Zwei Enzymaktivitäten, die mit den Membranen der Mikrosomenfraktion assoziiert sind, könnten das TEGDMA funktionell verändert haben. Zum einen die Aktivitäten des P450-Cytochrom/NADPH-Reduktase-Systems (Monooxygenasesystem), zum anderen diejenigen membrangebundener Esterasen.

Verschiedene P450-Isoenzyme unterschiedlicher Substratspezifität werden bevorzugt in der Säugetierleber exprimiert, die Expression einiger P450s wird durch exogene Substanzen (Xenobiotika) induziert (Gonzales, 1989; Guengerich, 1991). P450-Cytochrome katalysieren aromatische und aliphatische Hydroxylierungen, N-Oxidationen und S-Oxidationen, Dealkylierungen, Epoxidierung von Olefinen und die Halogenierung von Alkanen (Goldstein und Faletto, 1993). Aufgrund der funktionellen Gruppen des TEGDMA sind P450-katalysierte Epoxidierung, aliphatische Hydroxylierung oder die Initialisierung einer radikalischen Kettenreaktion möglich. Eine hydrolytische Spaltung des Moleküls zu Methacrylsäure und Triethylenglycol könnte durch eine mikrosomale Esteraseaktivität katalysiert werden (Abb. 4).

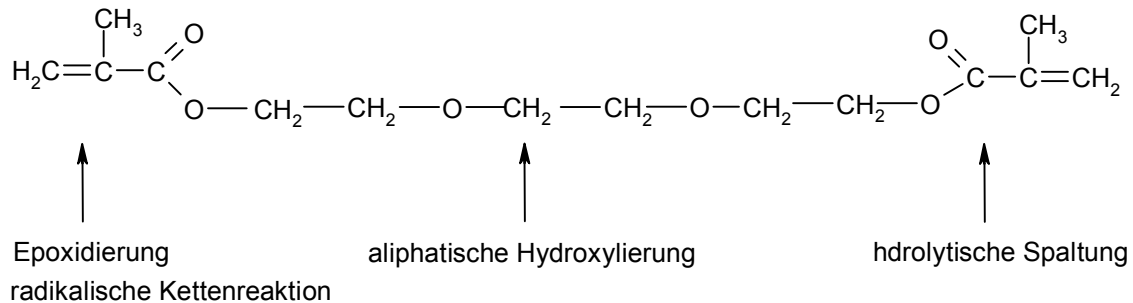


Abb.4: Reaktionsmöglichkeiten von P450-Cytochromen und mikrosomaler Esterasen am TEGDMA-Molekül.

Wahrscheinlich ist die Epoxidierung der Vinylgruppen des TEGDMA nicht die Reaktion, durch die die mutagene Wirkung der Substanz aufgehoben wird. Man würde in diesem Fall umgekehrt erwarten, daß auf diese Weise verändertes TEGDMA nicht nur im V79/HPRT-Test sondern auch im Ames-Test gerade in Anwesenheit einer Mikrosomenfraktion mutagen wäre. Mit großer Wahrscheinlichkeit hätte man so auch für die beiden Basismonomere Bis-GMA und UDMA in beiden Testsystemen mutagene Effekte erwarten dürfen. Eine aliphatische Hydroxylierung der Oxyethylengruppen ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$)_n des TEGDMA würde bedeuten, die Oxyethylengruppen induzierten Mutationen in V79-Zellen. Mutagene Effekte von Ethylenglycolethern sind in der Literatur beschrieben, allerdings nicht in Verbindung mit funktionellen Acrylat- oder Methacrylatresten (McGregor, 1984; Hoflack *et al.*, 1995). Aufgrund der oben beschriebenen mutagenen Aktivität von mono-, di- und multifunktionalen Acrylaten und korrespondierenden Methacrylaten im L5178Y/TK-Test darf man annehmen, daß auch die direkten mutagenen Effekte des TEGDMA in V79-Zellen in Zusammenhang mit der Substanzklasse der Acrylate und Methacrylate und nicht mit der Wirkung von Glycolethern zu diskutieren sind. Die Initiierung einer radikalischen Kettenreaktion an den Vinylgruppen des

TEGDMA durch die P450-Cytochrome ist nicht auszuschließen. Dieses Reaktionsprodukt sollte als Präzipitat im Kulturmedium erkennbar sein, es wurde jedoch hier nicht beobachtet.

Wahrscheinlicher als eine P450-katalysierte Reaktion ist der enzymatische Abbau des TEGDMA zu Methacrylsäure und Triethylenglycol durch eine membrangebundene Esterase-aktivität (Abb. 5). Membrangebundene mikrosomale Esteraseaktivitäten sind neben zyto-solischen beschrieben (Helia *et al.*, 1995; Hernandez *et al.*, 1996; Parker *et al.*, 1996). Es ist auch bekannt, daß Kompositmonomere durch Esteraseaktivitäten metabolisiert werden könnten (Bean *et al.*, 1996; Phillips *et al.*, 1996; Bean und Williams, 1997). Weil die Zytotoxizität von Bis-GMA, UDMA, TEGDMA und HEMA, nicht jedoch die des MMA in Anwesenheit einer S9-Fraktion im HPRT-Test deutlich reduziert wurde, darf man annehmen, daß auch diese Reaktionen in der vorliegenden Arbeit von membrangebundenen Esteraseaktivitäten und nicht von P450-Enzymen, wie in der Literatur beschrieben, katalysiert wurden (Hikage *et al.*, 1996). Es wurde außerdem berichtet, daß die Comonomere EGDMA, DEGDMA, TEGDMA und TETGDMA durch gereinigte Esteraseaktivitäten gespalten wurden (Yourtee *et al.*, 1997). Die geringe Toxizität des TEGDMA in V79-Zellen und im Ames-Test in Gegenwart einer Mikrosomenfraktion stimmt mit diesen Literaturdaten überein.

Zur Klärung der Frage nach dem Mechanismus der Inaktivierung des TEGDMA in V79-Zellen sollen Reaktionsprodukte nach Inkubation mit einer aktiven Mikrosomenfraktion mit HPLC analysiert werden. Man würde erwarten, daß mit steigenden Inkubationszeiten die Menge des Eduktes (TEGDMA) abnehmen und die Anteile des Zwischenproduktes Triethylenglycolmethacrylat und der Produkte Triethylenglycol und Methacrylsäure zunehmen sollten. Der Einsatz von Inhibitoren mikrosomaler Esteraseaktivitäten, beispielsweise von Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) in diesen Experimenten oder auch in Mutagenitätsprüfungen, ließe vermutlich zwischen Cytochrom P450-katalysierten und Esterase-katalysierten Reaktionen unterscheiden (Yumibe *et al.*, 1996).

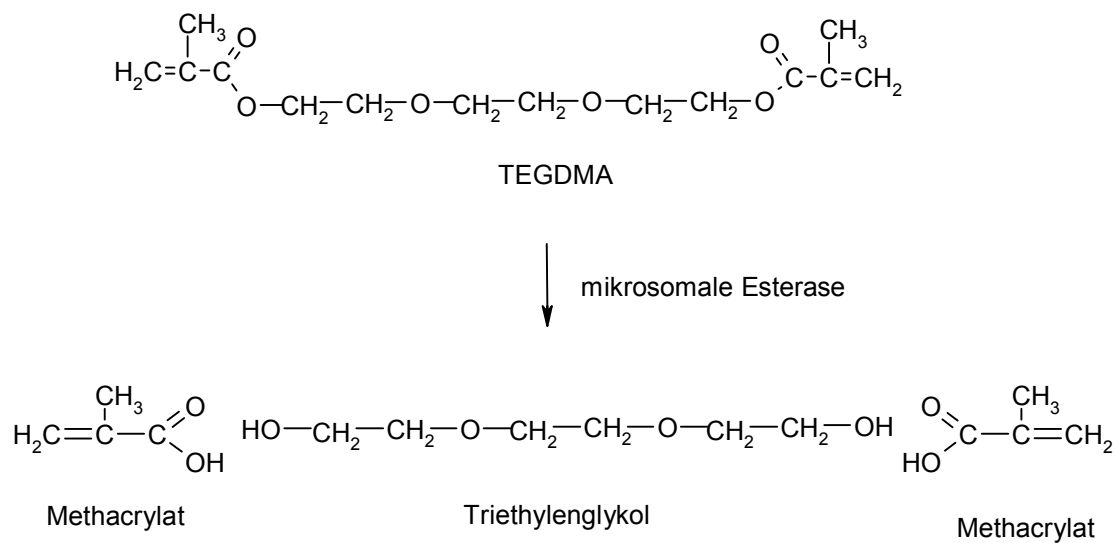


Abb. 5: Enzymatische Spaltung des TEGDMA durch eine mikrosomale Esteraseaktivität.

Hinweise auf die Wirkungsweise des TEGDMA geben die unterschiedlichen Ergebnisse aus den Analysen der Mutagenität der Substanz im Ames-Test und im V79/HPRT-Test aufgrund der unterschiedlichen Selektionssysteme für Mutanten. Die hier verwendeten *Salmonella*-Stämme TA100 und TA102 erkennen Mutagene, die Basenpaarsubstitutionen in GC-(TA100) oder AT-(TA102) reichen DNA-Abschnitten induzieren, die Stämme TA97a und TA98 erkennen solche Mutagene, die *frameshift*-Mutationen aufgrund kleiner Insertionen oder Deletionen in GC-reichen DNA-Abschnitten erzeugen. TEGDMA war in keinem der *Salmonella*-Stämme mutagen. Man kann annehmen, daß TEGDMA im Ames-Test kein Mutagen ist, oder aber Mutationen induzierte, die von den hier verwendeten Stämmen nicht erfaßt wurden. Auffällig war, daß sogar im nicht-toxischen Konzentrationsbereich mit steigenden TEGDMA-Mengen vor allem in den Stämmen TA97a und TA102 die Mutantenzahlen geringer waren als die Raten der spontanen Mutanten. Wäre eine Substanz nicht mutagen und nicht toxisch, sollten die Zahlen der *Salmonella*-Kolonien, die die Rate der Spontanreversion anzeigen, konstant bleiben. Es ist daher zu vermuten, daß TEGDMA Mutationen in den „Spontanrevertanten“ induzierte, die es diesen nicht mehr ermöglichten, Histidin zu synthetisieren. TEGDMA könnte damit nicht

Basenpaarsubstitutionen, sondern möglicherweise größere Deletionen induziert haben, die wegen der beschriebenen Eigenschaften der *Salmonella*-Stämme nicht als Mutationen erkannt wurden. Deletionen könnten große Teile des *His*-Operons betroffen haben, die für spontane *Salmonella*-Revertanten letal waren. Der V79/HPRT-Test zeigte im Unterschied zu den Teststämmen des Ames-Tests nicht nur Basenpaarsubstitutionen, sondern auch Insertionen und Deletionen jeder Größe an (Glatt, 1994). Deshalb ist wahrscheinlich für die Induktion von Mutationen durch TEGDMA ein ganz anderer Mechanismus wirksam als für das Glycidylmethacrylat. GMA induziert - wie oben ausgeführt -, wahrscheinlich als alkylierende Substanz Punktmutationen aufgrund von Basenpaarsubstitutionen.

Die mit der Kombination aus Ames-Test und V79/HPRT-Test erzielten Ergebnisse lassen Deletionen als TEGDMA-induzierten Mutationstyp vermuten. Deshalb wurden zunächst sowohl spontane als auch TEGDMA-induzierte V79-Mutanten isoliert. Anschließend wurde ein Deletionsscreening mit polymerase chain reaction (PCR) durchgeführt. Die molekularbiologische Analyse TEGDMA-induzierter HPRT-defizienter Zellen im Vergleich mit spontanen Mutanten sollte zeigen, ob DNA-Sequenzen der kodierenden Region des *HPRT*-Gens (Exons) aufgrund der TEGDMA-Wirkung verloren sind.

5 Molekulare Analyse TEGDMA-induzierter HPRT-defizienter V79-UL-Zellen mit Polymerase Chain Reaction

5.1 TEGDMA-induzierte Mutationen im *hprt*-Gen

Für die molekulare Analyse der TEGDMA-induzierten Mutationen wurden aus insgesamt 25 V79-UL-Kulturen, die für 4 Stunden mit 1 mMol/L TEGDMA behandelt wurden und aus ebenfalls 25 unbehandelten Zellkulturen je ein HPRT-defizienter V79-UL-Klon isoliert. Auf diese Weise wurden unabhängige HPRT-defiziente V79-Klone gewonnen. Parallel zu den Zellkulturen zur Isolierung von Mutanten wurden Mutantenraten in getrennten Ansätzen nach Exposition wie üblich ermittelt. Sowohl die spontan auftretenden als auch die TEGDMA-induzierten Mutantenhäufigkeiten der V79-UL-Zellen entsprechen den oben mit V79B-Zellen ermittelten Daten (vgl. Tabelle 26). Die TEGDMA-induzierte Mutantenrate lag mit 76 Mutanten pro 10^6 koloniebildenden V79-UL-Zellen etwa um den Faktor 25 über der Mutantenhäufigkeit in unbehandelten Zellkulturen (Tabelle 27). Dies deutet darauf hin, daß wahrscheinlich nur einer von insgesamt 25 isolierten TEGDMA-behandelten V79-UL-Klonen aufgrund einer Spontanmutation entstanden war.

Wie aufgrund publizierter Daten erwartet, enthielten alle spontanen HPRT-Mutanten sämtliche kodierenden Sequenzen der Exons 1 bis 9 des *hprt*-Gens (Tabelle 28 und Abb. 6). V79-UL-Zellen bildeten also spontan keine mit PCR erkennbaren Deletionen; man darf deshalb annehmen, daß sämtliche spontanen Mutationen dieser Zelllinie Punktmutationen sind. Gänzlich verschieden davon ist das Mutationsspektrum in TEGDMA-induzierten Mutanten. Lediglich einer von insgesamt 25 unabhängigen V79-UL-Klonen enthielt alle Exonsequenzen. Diese V79-Mutante sollte, wenn man die oben ermittelten Mutantenhäufigkeiten zugrunde legt, spontan entstanden sein. Die 24 V79-UL-Klone, die dann wahrscheinlich durch TEGDMA induziert wurden, enthielten Deletionen von Exonsequenzen in unterschiedlicher Größe.

Tabelle 27: Mutagenität des Triethylenglycoldimethacrylats (TEGDMA) in V79-UL-Zellen nach direkter Exposition für 4 h. 24 Stunden nach Exposition wurde die akute Zytotoxizität als relative Überlebensraten behandelter Kulturen (*plating efficiency*) ermittelt (PE 1). Die Gesamtzahl der 6-TG-resistenten Zellen wurde aus insgesamt in 6×10^6 plattierten Zellen bestimmt und daraus und aus den Raten der lebensfähigen (koloniebildenden) Zellen zu Beginn der Phase der Mutantenselektion (PE2) die Mutantenraten pro 10^6 Zellen errechnet. PE2 gibt die absolute Anzahl der Zellklone an, die aus insgesamt 300 ausgesäten V79-UL-Zellen / Zellkultur gewachsen sind.

TEGDMA (mMol/L)	PE1 (%)	PE2	6-TG ^R -Mutanten in 6×10^6 Zellen	Mutantenrate ($\times 10^{-6}$)
0	100	171	11	3
1,0	91	183	279	76

Tabelle 28: Zusammenfassung der PCR-Analyse der TEGDMA-induzierten HPRT-defizienten V79-UL-Klone.

TEGDMA (mMol/L)	analysierte Mutanten	Deletionen kodierender Sequenzen		
		Partialdeletionen	Totaldeletionen	Anteil der Deletionen insgesamt (%)
0	25	0	0	0
1,0	25	5	19	96

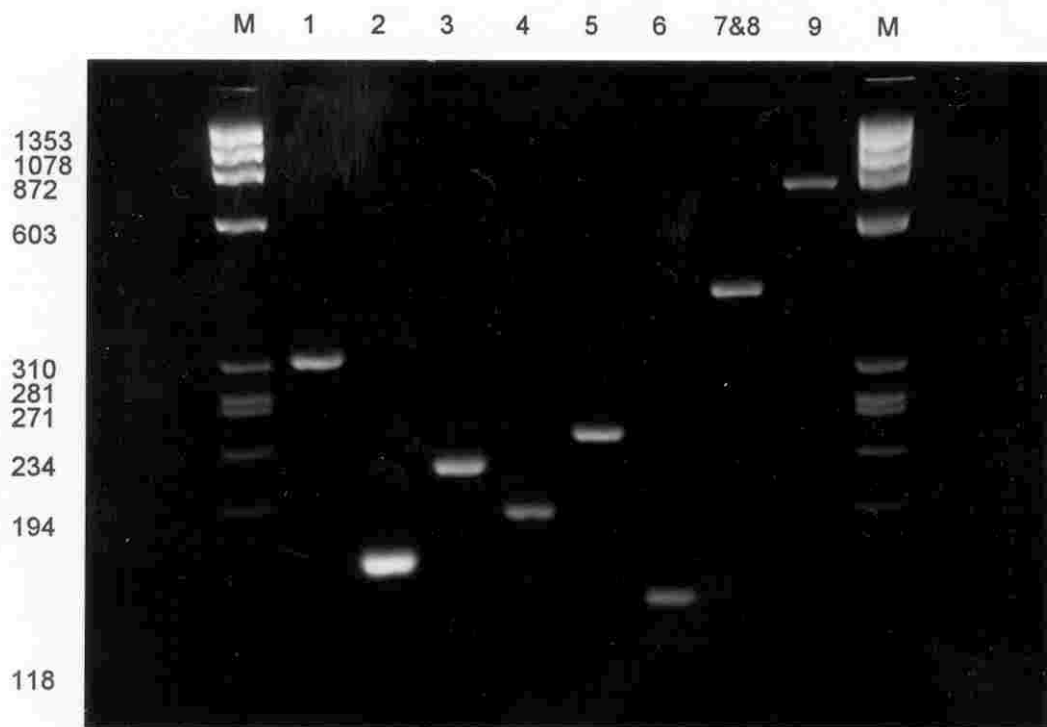


Abb. 6: Exonsequenzen des *hprt*-Gens eines spontanen HPRT-defizienten V79-UL-Klons. Flankiert vom Längenstandard (bp) M (Φ X 174/Hae III) sind in den Bahnen 1 bis 9 von links nach rechts die DNA-Fragmente aus den Reaktionsansätzen zur Amplifizierung der verschiedenen Exons 1 bis 9 des *hprt*-Gens des spontanen HPRT-defizienten V79-UL-Klons gezeigt. Alle Exonsequenzen sind vorhanden.

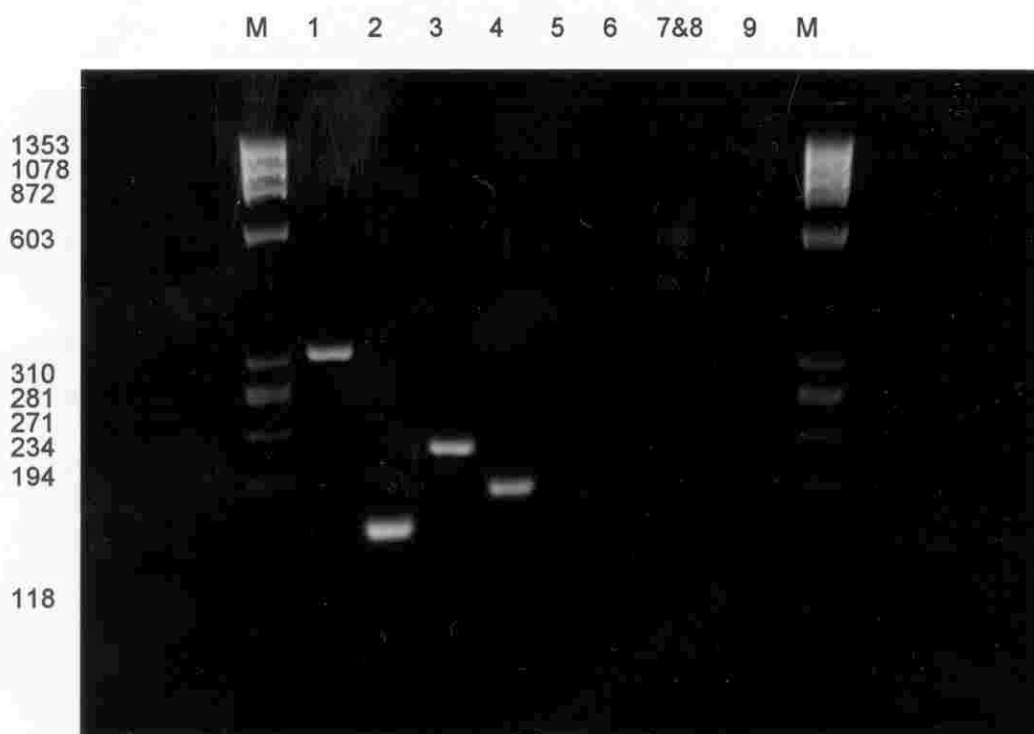


Abb. 7: Exonsequenzen des *hprt*-Gens des TEGDMA-induzierten V79-UL-Klons TEG-21. Flankiert vom Längenstandard (bp) M (Φ X 174/Hae III) sind in den Bahnen 1 bis 9 von links nach rechts die Reaktionsprodukte aus den Ansätzen zur Amplifizierung der verschiedenen Exons 1 bis 9 des *hprt*-Gens des TEGDMA-induzierten V79-UL-Klons TEG-21 gezeigt. Die Exonsequenzen 1 bis 4 sind vorhanden, die Sequenzen der Exons 5 bis 9 sind deletiert.

Tabelle 29: PCR-Analyse der Exonsequenzen in TEGDMA-induzierten HPRT-defizienten V79-UL-Klonen. +) die Exonsequenz ist vorhanden, -) die Exonsequenz fehlt

	<i>hprt</i> Exons							
	1	2	3	4	5	6	7&8	9
TEGDMA-induzierte V79-UL-Klone								
TEG-01	-	-	-	-	-	-	-	-
TEG-02	-	-	-	-	-	-	-	-
TEG-03	-	-	-	-	-	-	-	-
TEG-04	-	-	-	-	-	-	-	-
TEG-05	-	-	-	-	-	-	-	-
TEG-06	-	-	-	-	-	-	-	-
TEG-07	-	-	-	-	-	-	-	-
TEG-08	-	-	-	-	-	-	-	-
TEG-09	-	-	-	-	-	-	-	-
TEG-10	-	-	-	-	-	-	-	-
TEG-11	-	-	-	-	-	-	-	-
TEG-12	-	-	-	-	-	-	-	-
TEG-13	-	-	-	-	-	-	-	-
TEG-14	-	-	-	-	-	-	-	-
TEG-15	-	-	-	-	-	-	-	-
TEG-16	-	-	-	-	-	-	-	-
TEG-17	+	+	+	+	+	+	+	+
TEG-18	+	+	+	-	-	-	-	-
TEG-19	+	+	+	+	-	-	-	-
TEG-20	-	-	-	-	-	-	-	-
TEG-21	+	+	+	+	-	-	-	-
TEG-22	+	+	-	-	-	-	-	-
TEG-23	-	-	-	-	-	-	-	-
TEG-24	-	-	-	-	-	-	-	-
TEG-25	-	+	+	+	+	+	+	+

Fünf der HPRT-defizienten V79-UL-Klone hatten kodierende Exonsequenzen teilweise (Partialdeletionen) verloren (Tabelle 29). Die DNA-Fragmente aus den Reaktionsansätzen zur Amplifizierung der verschiedenen Exons des *hprt*-Gens des V79-UL-Klones #21 (TEG-21 in Tabelle 29), der aus einer TEGDMA-behandelten Zellkultur isoliert wurde, sind in Abbildung 7 gezeigt. Während die Sequenzen für die Exons 1 bis 4 amplifiziert wurden, fehlten die Exonsequenzen 5 bis 9 in diesem Zellklon. Anscheinend sind diese partiellen Deletionen nicht zufällig über das *hprt*-Gen verteilt. Meist waren die Sequenzen des 5'-Endes des Gens in den Mutanten mit Partialdeletionen vorhanden, es fehlten die Sequenzen am 3'-Ende des *hprt*-Gens.

In neunzehn V79-UL-Klonen konnten keine DNA-Fragmente kodierender Sequenzen amplifiziert werden, diese Sequenzen des *hprt*-Gens waren vollständig deletiert (Tabelle 29).

Erhält man in einem PCR-Ansatz kein Produkt, kann dieses Ergebnis zwei Gründe haben. Erstens, die zu amplifizierende Sequenz ist nicht vorhanden, oder, zweitens, die Reaktionsbedingungen waren nicht optimal gewählt. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb zunächst aus allen TEGDMA-induzierten Zellklonen die genomische DNA zweimal isoliert, aus den Klonen TEG-03, TEG-04, TEG-05, TEG-17, TEG-21 und TEG-25 sogar dreimal isoliert, um Fehler bei der DNA-Präparation auszuschließen. Mit sämtlichen Präparationen wurde das in Tabelle 29 gezeigte Mutationsspektrum erzielt. Als Kontrolle wurde in sämtlichen PCR-Ansätzen genomische DNA aus den Wildtypzellen mitgeführt, mit der ohne Ausnahme sämtliche Exonsequenzen in jeder PCR amplifiziert wurden.

5.2 Mechanismus der Induktion von V79-UL-Mutanten durch TEGDMA: Michael-Addition

Wie aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse der Mutagenitätsprüfungen im Ames-Test und im V79/HPRT-Test vermutet, induzierte TEGDMA überwiegend große Deletionen im *hprt*-Gen der V79-UL-Zellen. Da für die Substanzklasse der Acrylate bisher keine anderen molekularen Analysen induzierter Mutationsspektren publiziert sind, ist gegenwärtig nicht zu entscheiden, ob die Induktion von Deletionen für diese Substanzen charakteristisch ist oder ob vielleicht aufgrund der Wirkung anderer funktioneller Gruppen auch die Induktion von Punktmutationen möglich ist. Zumindest für die Diacrylate und die reaktiven methylsubstituierten Diacrylate, hier vertreten durch das TEGDMA, scheint die Induktion von Deletionen mit großer Wahrscheinlichkeit das bevorzugt induzierte Mutationsspektrum in Säugetierzellen zu sein. Dafür sprechen folgende Überlegungen, die auf Struktur-Aktivitätsbeziehungen beruhen. Acrylate und Diacrylate, wie das TEGDMA, sind α,β -ungesättigte Ester mit unterschiedlich stark elektronenziehenden Gruppen. Die Toxizität dieser Substanzen beruht möglicherweise auf der

somit unterschiedlichen Reaktivität der Doppelbindung mit zellulären Nukleophilen, beispielsweise den reduzierten SH-Gruppen von Cysteinresten in Peptiden und Proteinen und nukleophilen Gruppen von Desoxyribonukleosiden. Eine Untersuchung zur Struktur-Aktivitätsbeziehung verschiedener Acrylate und Methacrylate sowie korrespondierender Diacrylate und Dimethacrylate zeigte auch die hohe Reaktivität der Substanzen mit Glutathion. Überraschenderweise konnten jedoch keine Addukte mit Desoxyribonukleosiden nachgewiesen werden (McCarthy *et al.*, 1994). Eine Reaktion dieser Substanzen, auch des TEGDMA, mit genomischer DNA erscheint dennoch nicht unmöglich, weil DNA-Addukte der monofunktionalen Acrylsäure nachgewiesen sind (Segal *et al.*, 1987; Solomon, 1994).

Läßt man mögliche Veränderungen funktioneller Gruppen der Substanz durch intrazelluläre Enzymaktivitäten der Zielzellen außer acht, nimmt man also an, daß das TEGDMA direkt wirksam ist, ist ein chemischer Wirkungsmechanismus wahrscheinlich. Es ist möglich, daß TEGDMA über den Mechanismus einer Michael-Addition, einer nukleophilen Addition von Carbanionen an α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen, an Purinbasen, Adenin und Guanin, bindet. Wahrscheinlich erfolgt die Reaktion am N7, die Bildung anderer DNA-Addukte erscheint allerdings ebenso möglich zu sein (Solomon, 1994). Das bifunktionale TEGDMA könnte sogar über beide funktionellen Methacrylatgruppen kovalente Bindungen zu DNA-Bausteinen ausbilden. Wenn beide Acrylatgruppen mit entsprechend weit entfernten Purinbasen reagierten, wäre als Folge davon die Ausbildung eines *intra strand crosslinks* vorstellbar (Abb. 8). Wichtig sind hier die Konformationszustände der beiden Reaktionspartner. Bei günstigen Konformationszuständen der DNA und des gestreckten TEGDMA-Moleküls, könnten möglicherweise auch weiter entfernt liegende Purinbasen kovalent verknüpft werden. Wie daraus DNA-Strangbrüche, irreparable Deletionen großer genomischer DNA-Sequenzen oder möglicherweise auch Chromosomenaberrationen resultieren, bleibt für das TEGDMA und Acrylate allgemein zu erklären und ist auch für andere Substanzen nicht beschrieben.

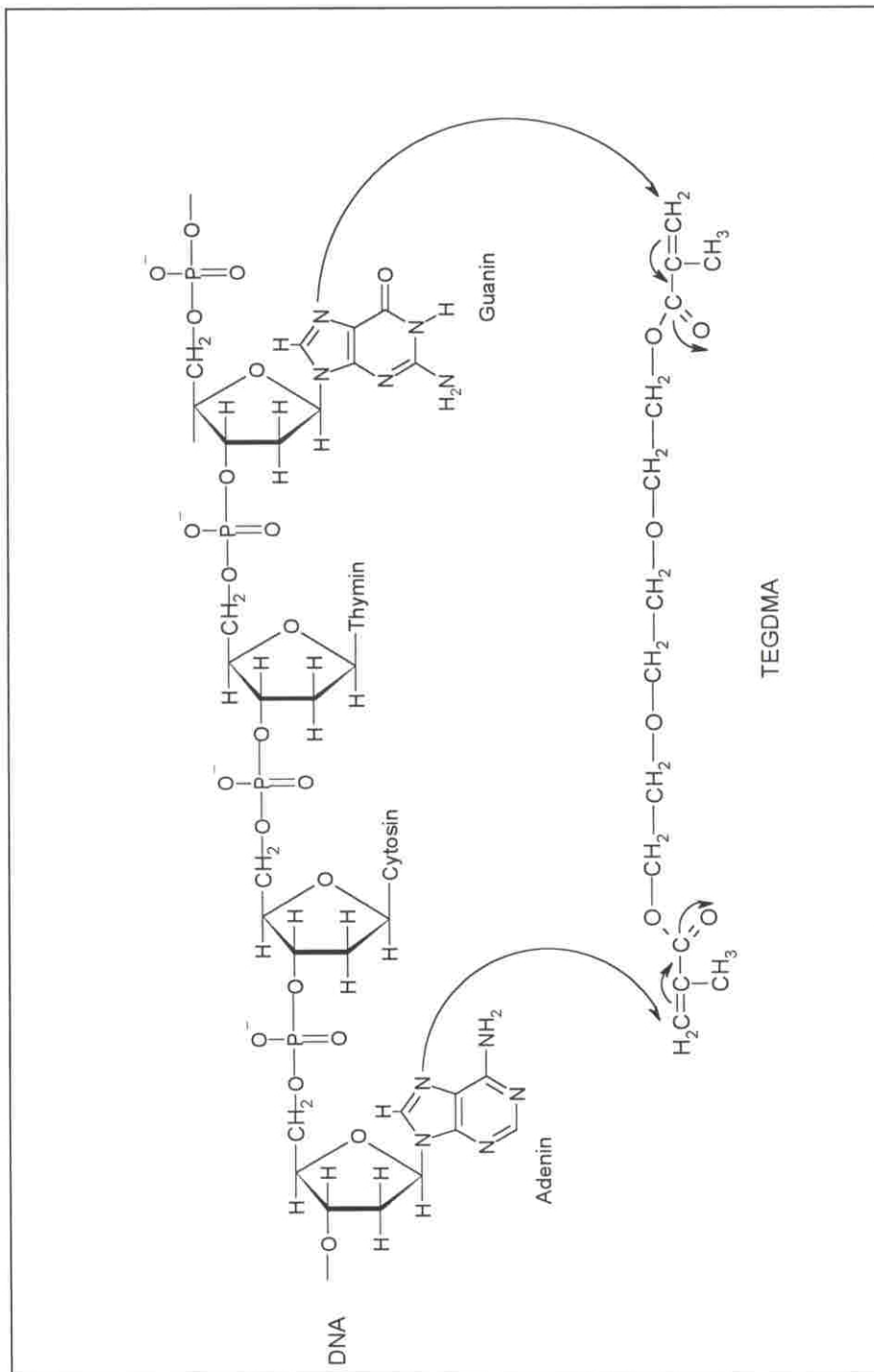


Abb.8: Modell der Reaktionen zwischen Purinbasen einzelsträngiger DNA und Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA).

Der hier diskutierte Mechanismus der TEGDMA-Wirkung, der vielleicht allgemein für reaktive Diacrylate gilt, erklärte auch, warum die beiden Basismonomere Bis-GMA und UDMA, beides bifunktionale Dimethacrylate, nicht ebenso wie das bifunktionale TEGDMA in V79-Zellen mutagen waren. Mehrere Unterschiede der beiden Moleküle verglichen mit TEGDMA sind hier wichtig. Zum einen werden möglicherweise für die Bindung eines Dimethacrylats an DNA hohe Konzentrationen einer Substanz benötigt. Bis-GMA und UDMA sind verglichen mit TEGDMA bei sehr viel niedrigeren Konzentrationen zytotoxisch. In diesem niedrigen Konzentrationsbereich stehen möglicherweise nicht genügend methylsubstituierte Acrylatgruppen für die Ausbildung einer kovalenten Bindung an DNA zur Verfügung. Selbst wenn nur eine Methacrylatgruppe des Bis-GMA oder des UDMA binden sollte, ist dies vielleicht zu wenig, um in V79-Zellen mutagen zu wirken. Möglicherweise ist auch der HPRT-Genort nicht sensitiv genug, um geringe mutagene Effekte der beiden Basismonomere aufzuzeigen (Moore *et al.*, 1989). Außerdem kommt möglicherweise aus sterischen Gründen keine Bindung des Bis-GMA und des UDMA mit der DNA zustande. Die beiden großen Basismonomere sind weniger flexibel als das kleinere TEGDMA, das wegen der Einfachbindungen der Ethergruppen frei rotieren kann.

Sehr wichtig für eine Erklärung der unterschiedlichen mutagenen Aktivitäten dieser bifunktionalen Dimethacrylate scheinen ihre unterschiedlichen Reaktivitäten zu sein. Es wurde diskutiert, daß die Reaktivität der Dimethacrylate von Mono- über Di- und Tri- bis zu Tetraethylenglycolen mit steigendem Abstand der beiden Methacrylatgruppen zunimmt (Peutzfeldt, 1997). Das TEGDMA ist aber wahrscheinlich nicht wegen des großen Abstandes zwischen den beiden Methacrylatgruppen, sondern wegen der drei Ethergruppen zusätzlich zur elektronenziehenden Wirkung der Carboxylatgruppen sehr viel reaktiver als das Bis-GMA und das UDMA. Es ist bekannt, daß die Konversionsraten eines Bis-GMA/TEGDMA-Polymers mit steigendem Anteil an Bis-GMA sinken, also aufgrund des reaktionsträgen Bis-GMAs weniger Methacrylatgruppen miteinander reagieren (Peutzfeldt, 1997). In Analogie dazu reicht möglicherweise der Energieinhalt der Dimethacrylatgruppe des Bis-GMAs und des UDMA nicht

für die Ausbildung genügend vieler kovalenter Bindungen zu zellulären Nukleophilen, beispielsweise an das N7 des Guanins.

Die hier mit TEGDMA erzielten Ergebnisse und die im Zusammenhang damit diskutierten Reaktionsmechanismen aufgrund besonderer Struktur-Aktivitätsbeziehungen helfen möglicherweise auch, das Auftreten der durch Acrylat- und Methacrylatester induzierten kleinen Kolonien im L5178Y/TK-Genmutationstest zu erklären. Diese kleinen Kolonien werden als Hinweis auf klastogene Effekte einer Prüfsubstanz diskutiert, sie sind aber auch charakteristisch für Substanzen, die große Deletionen induzieren (Dearfield *et al.*, 1989; DeMarini *et al.*, 1989). Da DNA-Doppelstrangbrüche, wie weiter unten kurz zu diskutieren ist, Deletionen von DNA-Sequenzen immer vorausgehen, würden sich so auch die durch manche Acrylate induzierten Chromosomenaberrationen und Mikrokerne in den Lymphomzellen der Maus erklären lassen (Moore *et al.*, 1988; Dearfield *et al.*, 1989).

5.3 Vergleichende Analyse der Induktion von Deletionen im HPRT-Gen

TEGDMA, ein reaktives methylsubstituiertes Acrylat also, induzierte wahrscheinlich ausschließlich Deletionen im *hprt*-Gen. Es gibt auch andere physikalische und chemische Agenzien, die dieses Mutationsspektrum in Säugetierzellen induzierten. So erzeugten Röntgen- und γ -Strahlen, aber auch α -Teilchen, bevorzugt große Deletionen in Hamsterzellen (Vrieling *et al.*, 1985; Thacker, 1986; Schwartz *et al.*, 1994). Der Anteil der Deletionen am gesamten Mutationsspektrum im *hprt*-Gen betrug etwa 60 bis 70%, es wurden überwiegend Totaldeletionen verursacht (Aghamohammadi *et al.*, 1992; Fuscoe *et al.*, 1992). Es ist allerdings möglich, daß Röntgenstrahlen in unterschiedlicher Dosis verschiedene Mutations-spektren induzierten (Morgan *et al.*, 1990). Das radiomimetische Bleomycin, eine chemotherapeutische Substanz, verursachte in mehr als 40% aller induzierten *hprt*-Mutationen große Deletionen. In Anwesenheit eines Hemmstoffes der DNA-Reparatur stieg dieser Anteil sogar auf mehr als 70% (Köberle *et al.*, 1991; Köberle und Speit, 1991). In ähnlicher Weise und mit etwa derselben

Häufigkeit waren Neocarzinostatin und Adriamycin wirksam, wobei Adriamycin anscheinend sehr große Deletionen induzieren kann (Helbig *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1994; Helbig *et al.*, 1995).

Auffällig war, daß Partialdeletionen des *hprt*-Gens nach Applikation recht verschiedener Agenzien in vielen Fällen nicht zufällig verteilt waren. Wie auch für die Induktion partieller Deletionen durch das TEGDMA in der vorliegenden Arbeit angezeigt, wurden diese Mutationen überwiegend im 3'-Ende des *hprt*-Gens induziert (Morgan *et al.*, 1990; Köberle *et al.*, 1991). Neben den eben diskutierten substanzinduzierten Partialdeletionen in Säugetierzellen trat dieses Mutationsmuster in menschlichen TK6-Zellen auch spontan auf (Giver *et al.*, 1995; Lichtenauer-Kaligis *et al.*, 1995). Es wurde daher spekuliert, daß im Bereich der Sequenzen des Exons 5 gehäuft Deletionsbruchpunkte auftreten, die zu Deletionen am 3'-Ende des Gens führen (Morgan *et al.*, 1990; Thacker *et al.*, 1990). Die Identifizierung von Bruchstellen im *hprt*-Gen des Hamsters ist allerdings bisher wegen unvollständiger Sequenzinformation in Intronsequenzen nicht möglich. Partielle Deletionen sind nicht ausschließlich auf das 3'-Ende des *hprt*-Gens beschränkt. Sie waren im menschlichen HPRT-Gen *in vivo* ganz zufällig verteilt (Nicklas *et al.*, 1989) und auch Adriamycin induzierte ebenfalls Partialdeletionen von Exonsequenzen ohne auffällige Verteilung auf bestimmte Bereiche des *hprt*-Gens in V79-Zellen. Aufgrund der molekularen Analysen der Adriamycin-induzierten Partialdeletionen ist sicher, daß die primären DNA-Läsionen, die diesen induzierten Deletionen vorausgingen, durch ganz andere Mechanismen entstanden sind als diejenigen, die durch Bleomycin induziert wurden (Helbig *et al.*, 1994).

TEGDMA induzierte in der vorliegenden Arbeit im *hprt*-Gen der V79-Zellen überwiegend große Deletionen. Das Auftreten großer Deletionen in höherem Maße als dies aufgrund der Wirkung von Röntgenstrahlen oder anderer chemischer Mutagene bisher bekannt war, ist für eine Reihe von Substanzen beschrieben. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, daß vor allem quervernetzende (*crosslinking*) Substanzen überwiegend dieses Mutationsmuster induzieren. Beispielsweise verursachte Mitomycin große Deletionen in menschlichen Lymphozyten und

auch die Mutanten, die nach Mitomycinbehandlung im L5178Y-TK-Test isoliert wurden, enthielten zu mehr als 90% Totaldeletionen des TK-Genorts (Janatipour *et al.*, 1988; Davies *et al.*, 1993). Auch das DNA-alkylierende cis-Platin induzierte Deletionen in *Drosophila melanogaster* (Cizeau *et al.*, 1996). Chlorambucil bildete *crosslinks* mit zellulären Makromolekülen; es war in Kurzzeittests genotoxisch und mutagen (Singh und Gupta, 1983). Dieses bifunktionale alkylierende Chemotherapeutikum induzierte überwiegend große Deletionen in Keimzellen der Maus, nicht jedoch in V79-Zellen *in vitro* (Russel *et al.*, 1989; Rinchik *et al.*, 1990, Speit *et al.*, 1992). Ähnlich wie das Chlorambucil in Mauszellen, erzeugte das Hexamethylamin, ebenfalls eine chemotherapeutische Substanz, zu mehr als 90% große Deletionen in Keimzellen von *Drosophila* (Aguirrezabalaga *et al.*, 1995). Das hier skizzierte Mutationsspektrum von Deletionen, das bifunktionale alkylierende Agenzien bildeten, unterscheidet sich grundlegend von demjenigen, das von monofunktionalen alkylierenden Substanzen hervorgebracht wurde. Diese Substanzen induzierten bevorzugt Punktmutationen *in vitro* und *in vivo* (Pastink *et al.*, 1989; Davies *et al.*, 1993; Sierra *et al.*, 1993; Helbig *et al.*, 1995).

Die wohl wichtigste primäre Läsion bei der Entstehung von Deletionen und Chromosomenaberrationen ist die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen. Es wird angenommen, daß ein mechanistischer Zusammenhang zwischen der Induktion von Doppelstrangbrüchen und der Entstehung von Deletionen und Chromosomenaberrationen besteht (Obe *et al.*, 1992; Phillips und Morgan, 1993). Mehrere Modelle werden diskutiert, die Ausbildung von Deletionen aufgrund verschiedener Prozesse zu erklären (Sankaranarayanan, 1993). Ein Wirkungsmechanismus führt möglicherweise über kurze DNA-Sequenzen von zwei bis sechs Basenpaaren (*repeats*) zu beiden Seiten der deletierten DNA-Sequenz (Albertini *et al.*, 1982; Krawczak und Cooper, 1991). Dieses Erscheinungsbild tritt auf molekularer Ebene im Falle von Erbkrankheiten auf, die auf Deletionen genomischer DNA basieren (Henthorn *et al.*, 1990; Love *et al.*, 1991; Singh *et al.*, 1997; Small *et al.*, 1997; Steck *et al.*, 1997). Die Beteiligung kurzer *repeats* wird bei der Entstehung vor allem kleiner spontaner Deletionen angenommen. Nach

dem *slipped mispairing*-Modell werden während der DNA-Synthese zwei auf einem DNA-Strang benachbarte homologe Sequenzen gegen die komplementären Sequenzen verschoben. Ein einzelsträngiger Loop, der aufgrund der fehlerhaften Basenpaarung entsteht, wird durch DNA-Reparatursysteme entfernt (Streisinger *et al.*, 1966). Deletionsmutanten des *HPRT*-Gens menschlicher Lymphozyten scheinen über diesen Mechanismus zu entstehen (Lambert *et al.*, 1995; Osterholm *et al.*, 1995). Ein alternativer Erklärungsansatz sieht vor, daß an Doppelstrangbrüchen zunächst DNA-Sequenzen exonukleolytisch abgebaut werden. Daraus resultieren Zwischenprodukte mit langen einzelsträngigen Enden. Homologe Sequenzen dieser Enden führen zu Basenpaarungen, überhängende DNA-Sequenzen werden abgedaut, die Lücken aufgefüllt und die Enden ligiert (Thacker *et al.*, 1992). Ob große Deletionen auf vergleichbare Weise entstehen können, ist gegenwärtig nicht bekannt. Es werden dafür Mechanismen diskutiert, die auf Rekombinationsereignissen und Crossover-Konfigurationen bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen beruhen und die vielfach von einem Verlust großer DNA-Sequenzen begleitet sind (Szostak *et al.*, 1983).

TEGDMA ist bisher das einzige Diacrylat, dessen induziertes Mutationsspektrum hier mit der polymerase chain reaction zumindest teilweise auf molekularer Ebene analysiert wurde. Inwiefern das TEGDMA-induzierte Mutationsmuster charakteristisch für mono-, di- oder multifunktionale Acrylate allgemein ist, sollten künftige Untersuchungen zeigen. Interessant wird dabei sein, ob die Comonomere Mono-, Di, Tri- oder Tetraethylenglycoldimethacrylat unterschiedlich stark mutagen sind und unterschiedliche Mutationsspektren induzieren können. Unterschiede können vielleicht dazu führen, eines dieser Derivate künftig bevorzugt in Kompositfüllungsmaterialien auf Dimethacrylatbasis zu verwenden.

6 Strategien und Normen für die Durchführung von Genotoxizitätsprüfungen

Die genetische Toxikologie identifiziert Substanzen, deren toxische Wirkung sich direkt auf die vererblichen Komponenten lebender Organismen richtet. Es werden Substanzen analysiert, die direkt oder indirekt mit DNA interagieren und sie in nicht-toxischen Konzentrationen verändern können. Genotoxizität bedeutet die Schädigung der Struktur der zellulären DNA durch Mutationen, chromosomale Änderungen oder Einzel- oder Doppelstrangbrüche aufgrund eines Ereignisses oder mehrerer Einwirkungen einer chemischen Substanz oder physikalischer Strahlen (Bridges, 1984; Clayson und Arnold, 1991). Diese genetischen Endpunkte werden in Strategien zur Prüfung der Genotoxizität von Chemikalien oder anderer konsumierbarer Produkte berücksichtigt.

6.1 Strategien der Genotoxizitätsprüfung

Das vorrangige Ziel der genetischen Toxikologie ist es, das Risiko für den Menschen abzuschätzen, aufgrund der Wirkung chemischer Substanzen oder physikalischer Strahlen Schäden der zellulären DNA zu erleiden. Allerdings wird von keinem in der genetischen Toxikologie tätigen Experten bezweifelt, daß kein einzelnes *in vitro* oder *in vivo* Testverfahren dazu fähig ist, zuverlässig die genotoxische Wirkung einer Substanz in Menschen vorherzusagen (Madle und Lang, 1993). Es ist seit dem Ende der 60er Jahre nach dem Erscheinen der Arbeiten von Ames und Mitarbeitern, die die Karzinogenität chemischer Substanzen in einem einfachen *in vitro* Testsystem erfassen, bis heute eine offene Diskussion, welche Strategie verfolgt werden soll, um für den Menschen genotoxische Substanzen zuverlässig zu identifizieren. Dies ist wohl auch der Grund dafür, daß keine der unten angeführten und heute gültigen Normen eine genaue Strategie zur Mutagenitätsprüfung festlegt

und keine Richtlinien zur Interpretation der experimentellen Daten enthält. Allerdings schließt die Empfehlung, Genotoxizitätstests durchzuführen, ein, an einem Punkt die Prüfungen zu beenden und eine Einschätzung des mutagenen oder genotoxischen Potentials einer Substanz in Säugetieren vorzunehmen (Madle und Lang, 1993).

Mitte der 70er Jahre wurden zwei unterschiedliche Strategien zur Prüfung der Genotoxizität diskutiert und auch praktisch umgesetzt. Das hierarchische Stufenmodell (*tier*) empfiehlt, die Substanzen in drei aufeinander folgenden Stufen zu testen (Bridges, 1973; Bridges, 1974; Flamm, 1974; Bridges, 1976). Auf der ersten Stufe werden für alle Prüfsubstanzen hauptsächlich bakterielle Mutagenitätstests eingesetzt, die schnell, zuverlässig und kostengünstig durchzuführen sind. Substanzen, die weitergeführt werden, werden mit Säugetierzellen *in vitro* (Stufe 2) und *Drosophila* oder verschiedenen Säugetieren *in vivo* (Stufe 3) geprüft. Das Stufenmodell beschreibt ein kostengünstiges Vorgehen, die Durchführung ist jedoch relativ zeitintensiv und die Ergebnisse sind aufgrund der Eigenheiten der Testsysteme der ersten Stufe nicht immer zuverlässig.

Das Stufenmodell wurde deshalb in der Folgezeit von der Idee abgelöst, Testbatterien einzusetzen, die heute in vielen Normvorschriften empfohlen werden. Testbatterien enthalten bevorzugt verschiedene Prüfverfahren, die mit Organismen verschiedener phylogenetischer Organisationshöhe und verschiedenen genetischen Endpunkten simultan durchzuführen sind. Eine Testbatterie sollte prokaryotische und eukaryotische Zellkulturen und *in vivo* Prüfverfahren enthalten (Sobels, 1985; Ashby, 1986; Rosenkranz, 1988, Ashby, 1989; Sobels, 1990; Tennant und Zeiger, 1993). Daten für die Risikoabschätzung stammen letztlich aus *in vivo* Untersuchungen an Nagetieren (Ashby *et al.*, 1996).

Die Prüfverfahren sollten Substanzen identifizieren, die spezifisch mit der DNA und nicht unspezifisch mit Makromolekülen reagieren. Außerdem sollten sie die Fähigkeit haben, Substanzen metabolisch zu aktivieren oder zu inaktivieren. Die Ergebnisse müssen reproduzierbar sein, und die Verfahren sollten in verschiedenen Laboratorien etabliert sein, um Ergebnisse auch so vergleichen zu können (Brusick und Auletta, 1985). Tests zur Abschätzung gesundheitlicher Risiken für den Menschen erfassen vor allem direkte Schädigungen der Keimzellen behandelter Tiere oder vererbare Effekte in ihrer Nachkommenschaft (Williams, 1989). Aus praktisch-methodischen und pragmatischen Gründen werden Mutagenitätstests jedoch meistens nicht an Keimzellen, sondern an somatischen Zellen durchgeführt. Man geht also davon aus, daß Keimzellmutagen in somatischen Zellen und Somazellmutagen in Keimzellen wirken, insofern als man plausibel annehmen kann, daß die zu prüfenden Substanzen (oder Metabolite) die Keimzellen erreichen können (Madle und Lang, 1993). Ausführliche Übersichten über verschiedene *in vitro* und *in vivo* Prüfverfahren, die Gen-, Chromosom-, und Genommutationen sowie die Fähigkeit zur Reparatur von DNA-Schäden erfassen, sind an anderer Stelle erschienen (Venitt und Parry, 1984; Fahrig, 1993).

Nach gegenwärtigem Verständnis können Mutationen in somatischen Zellen zur malignen Entartung der Zellen führen. Chemische Karzinogene können diese Mutationen im genetischen Material eines Organismus auslösen, die dann in einem mehrstufigen Prozeß zur Tumorbildung führen (Benigni und Giuliani, 1988). Ob eine Substanz als karzinogen für den Menschen einzuschätzen ist, wird experimentell üblicherweise an Ratten und Mäusen geprüft (Ashby und Purchase, 1993; Tennant, 1993). Viele der bekannt karzinogenen Substanzen waren auch *in vitro* und *in vivo* genotoxisch oder mutagen. Man versucht deshalb umgekehrt durch die Anwendung von Genotoxizitätstests und Mutagenitätstests abzuschätzen, ob eine Substanz in somatischen Zellen von Ratten oder Mäusen DNA-Schäden auslösen kann (Tennant *et al.*, 1987b; Ashby *et al.*, 1996).

Bei der Auswahl der Testsysteme für Mutagenitätsprüfungen wird wegen ständig neuer Entwicklungen keine starre Testbatterie empfohlen. Allerdings wird darauf hingewiesen, die Prüfungen mit Testsystemen durchzuführen, deren Methodik und deren Kriterien der Ergebnisbeurteilung allgemein anerkannt sind. In der Regel wird die Prüfung genotoxischer Effekte einer Substanz in zwei Abschnitten vorgenommen. Auf eine initiale Basisprüfung mit verschiedenen *in vitro* Systemen, die Gen- und Chromosomenmutationen erfassen, können *in vivo* Prüfungen folgen. Man beginnt *in vitro* üblicherweise mit Genmutationstests an Bakterien und Säugetierzellkulturen. Erhält man zusätzlich eindeutig positive Befunde bei der Prüfung der Induktion von Chromosomenaberrationen an Säugetierzellen, sollte ein Chromosomenaberrationstest oder ein Mikrokernstest *in vivo* durchgeführt werden (Madle und Lang, 1993; Ashby *et al.*, 1996). Negative Befunde in den anfänglichen Basisprüfungen sollten unter Umständen mit alternativen biologischen Endpunkten *in vivo* kontrolliert werden, wenn Menschen hohen Konzentrationen der Substanz ausgesetzt sind. Positive Befunde in validierten Testsystemen *in vitro* sind schwer zu beurteilen, wenn sie nur bei hohen Konzentrationen der Prüfsubstanz gemessen wurden. In diesen Fällen ist eine Dosis-Wirkungsbeziehung nachzuweisen. Sollte keine eindeutige Interpretation möglich sein, bleibt nur, weitere Tests durchzuführen (Fahrig *et al.*, 1991; Madle und Lang, 1993).

6.2 Standardprüfverfahren: Nationale und internationale Normen zur Prüfung der Gewebeverträglichkeit von Medizinprodukten

Für die Prüfung der Gewebeverträglichkeit von Medizinprodukten, zahnärztliche Werkstoffe eingeschlossen, liegen internationale Normen vor (ISO, 1992a). Die Norm ISO 10993-3 empfiehlt für die Prüfung der Genotoxizität eines Medizinproduktes *in vitro*-Prüfungen zu verwenden, die DNA-Effekte, Genmutationen und Chromosomenaberrationen erfassen. Wenigstens zwei dieser Tests sollten bevorzugt Säugetierzellen als Zielzellen verwenden (ISO,

1992b). Ames-Test und V79/HPRT-Test, die in der vorliegenden Arbeit zur Prüfung der Mutagenität verschiedener Kompositmonomere verwendet wurden, werden hier unter dem Hinweis auf die OECD-Richtlinien als *in vitro*-Verfahren empfohlen. *In vivo*-Prüfmethode sollen durchgeführt werden, wenn die *in vitro* Befunde auf ein genotoxisches Potential eines Werkstoffes hinweisen (ISO, 1992b; OECD, 1993). Die europäische Norm DIN EN 30 993-3 "Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 3: Prüfungen auf Genotoxizität, Karzinogenität und Reproduktionstoxizität" hat den Status einer deutschen Norm und enthält die Übersetzung der ISO 10993-3 (DIN, 1994).

Methoden speziell zur biologischen Prüfung zahnärztlicher Werkstoffe (*medical devices used in dentistry*), die zu Normen zusammengefaßt werden, sollen der Qualitätssicherung dieser Werkstoffe dienen. Verfahren zur Prüfung der Genotoxizität (Mutagenität) dentaler Werkstoffe sind fester Bestandteil dieser Normen. Auf nationaler Ebene wurde die DIN-Vornorm 13930 zur biologischen Prüfung von Dentalwerkstoffen von der europäischen Norm EN ISO 7405 zur präklinischen Beurteilung der Gewebeverträglichkeit von Medizinprodukten in der Zahnheilkunde abgelöst (CEN, 1997). Die europäische Norm EN ISO 7405 entstammt der Norm ISO 7405, die in der Auswahl der Prüfungen in weiten Teilen auf die ISO-Normen-Serie 10993 verweist (ISO, 1997). Die Prüfverfahren werden darin in drei Gruppen eingeteilt. Die Prüfverfahren der Gruppe II beinhalten neben Prüfungen der akuten und subchronischen Toxizität, lokaler Effekte nach Implantation, der Hautreizung und Sensibilisierung auch die Verfahren zur Prüfung der Genotoxizität (CEN, 1997). Unter dem Hinweis auf die internationalen Richtlinien sind also Ames-Test und V79/HPRT-Test in der Norm EN ISO 7405 enthalten.

6.3 Extrapolation genotoxischer Befunde auf den Menschen

Gesundheitsgefährdungen des Menschen zu bestimmen, die auf erhöhten Mutationsraten des genetischen Materials aufgrund der Exposition gegenüber mutagenen Substanzen beruhen, war seit den ersten Tagen der genetischen Toxikologie eine problematische Aufgabe. Auch wenn man in manchen Fällen Informationen aufgrund der Exposition von Somazellen exponierter Individuen oder kultivierter menschlicher Zellen erhalten kann, wird meist die Zellart verschieden von den wirklichen Zielzellen der Mutagene sein und die Dosis *in vitro* wird meist erheblich höher sein als diejenige, denen Menschen wirklich ausgesetzt sind (ICPEMC, 1983; Clayson und Arnold, 1991).

Die Daten, auf deren Basis erhöhte Mutationsraten im Menschen quantitativ geschätzt werden, werden in Tierexperimenten ermittelt und nicht an Menschen selbst. Tierexperimente werden üblicherweise aufgrund der Mutagenitätsbefunde durchgeführt, die in Basisprüfungen *in vitro* erzielt wurden. Die Extrapolation experimenteller Befunde aus Tierversuchen auf den Menschen sollte üblicherweise in mehreren Stufen erfolgen, die hier nur kurz aufgeführt werden, weil sie an anderer Stelle ausführlich beschrieben wurden (Clayson und Arnold, 1991). Die Ergebnisse, die mit hohen experimentellen Dosen erzielt wurden, auf Effekte zu extrapolieren, die mit niedrigen Dosen bei der gleichen Spezies hervorgerufen werden, ist schwierig, wenn keine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung vorliegt oder keine Hinweise auf eine Schwellenkonzentration bekannt sind. Weil üblicherweise experimentelle Daten aus praktischen Gründen mit Somazellen erhoben werden, sollte auf die Wirkung in Keimzellen extrapoliert werden. Die Extrapolation von Spezies zu Spezies wiederum erfordert eine Abschätzung vieler physiologischer Parameter, die oft unbekannt sind (ICPEMC, 1983; Brusick, 1987; Clayson und Arnold, 1991; Ehling, 1991).

Es wurde in der genetischen Toxikologie für die Extrapolation tierexperimenteller Befunde auf den Menschen eine Theorie entwickelt, die man als Parallelogrammkonzept (*parallelogram approach*) bezeichnet und die auf Sobels zurückgeht (Sobels, 1989; Sobels, 1993). Ihr zufolge sollte es möglich sein, die Induktion genetischer Schäden in menschlichen Keimzellen abzuschätzen, indem ein gemeinsamer genetischer Endpunkt in Menschen und Nagern herangezogen wird. Es werden zunächst Mutationen oder Chromosomenschäden in Lymphozyten von Menschen und Mäusen quantitativ bestimmt. Diese Relation und eine weitere Relation der Mutantenraten in Lymphozyten und Keimzellen von Mäusen werden benutzt, um auf Wirkungen in menschlichen Keimzellen zu schließen. Die quantitative Bestimmung der Bildung von DNA-Addukten könnte zudem herangezogen werden, Mutagenitätsbefunde von einem Zelltyp auf einen anderen in demselben Individuum oder derselben Spezies oder von einer Spezies auf eine andere zu extrapolieren (Van Zeeland *et al.*, 1985).

6.4 Einschätzung der Mutagenität der Kompositmonomere

Für die in der vorliegenden Arbeit geprüften Kompositmonomere liegen über deren Mutagenität im Ames-Test und im V79/HPRT-Test hinaus teilweise Befunde zur Genotoxizität *in vitro* und *in vivo* vor. Diese Daten sind für die Einschätzung ihrer genotoxischen Aktivität *in vitro* wichtig und sie sind die Basis für das weitere experimentelle Vorgehen (Tabelle 30). Für die Methacrylate Bis-GMA, UDMA und Methylmethacrylat konnte jeweils in einem der Prüfverfahren eine zumindest geringe genotoxische Wirkung nicht ausgeschlossen werden (Heil *et al.*, 1996). Glycidylmethacrylat und TEGDMA waren in mindestens einem der Mutagenitätstests eindeutig mutagen. Man darf annehmen, daß Glycidylmethacrylat aufgrund der positiven Befunde im Ames-Test, dort vor allem in *S. typhimurium* TA100, und im V79/HPRT-Test Basenpaarsubstitutionen induzierte. HEMA und Bisphenol A hingegen sind die einzigen Substanzen, für die in allen Testsystemen eindeutig keine genotoxische oder mutagene Aktivität nachgewiesen wurde.

Tabelle 30: Mutagenität und Genotoxizität einiger Kompositmonomere in verschiedenen Testsystemen. Hier sind die Ergebnisse der in der vorliegenden Arbeit geprüften Substanzen mit denjenigen aus Untersuchungen von Heil *et al.* (1996) zur Genotoxizität *in vitro* (*umu*-Test und DNA *synthesis inhibition test*, DIT) und *in vivo* (AFE, alkalische Filterelution, *Dreissena polymorpha* und *Corbicula fluminea*) verglichen. n.t. = nicht getestet

Substanz	Testsystem				
	<i>umu</i> -Test	DIT	AFE	Ames-Test	V79/HPRT
Bis-GMA	negativ	positiv	negativ	negativ	negativ
UDMA	negativ	negativ	(positiv)	negativ	negativ
TEGDMA	n.t.	n.t.	n.t.	negativ	positiv (- S9) negativ(+ S9)
GMA	n.t.	n.t.	n.t.	positiv (-S9) positiv (+S9)	positiv (-S9) negativ (+S9)
Bisphenol A	n.t.	n.t.	n.t.	negativ	negativ
HEMA	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
MMA	negativ	negativ	negativ	negativ	(positiv)

Für die Einschätzung der positiven und negativen Befunde in den beiden Genmutationstests *in vitro* ist nochmals kurz auf die Leistungsfähigkeit der Testsysteme einzugehen. Der Ames-Test identifiziert Mutagene, die zu Basenpaarsubstitutionen führen oder aufgrund kleiner Insertionen oder Deletionen in *frameshift*-Mutationen resultieren. Substanzen, die große Deletionen induzieren, werden also im Ames-Test nicht als mutagen erkannt. Mit einiger experimenteller Erfahrung kann man jedoch aufgrund des speziellen Erscheinungsbildes der induzierten Phänomene auch mit dem Ames-Test die Induktion von Deletionen vermuten. Mit steigenden Konzentrationen der Prüfsubstanz wird die Rate der Spontanrevertanten geringer, der Hintergrundrasen ist allerdings vorhanden. Dies bedeutet, daß im nicht-toxischen

Konzentrationsbereich gemessen wurde. TEGDMA führte aufgrund der positiven Effekte im V79/HPRT-Test und der molekularen Analysen der induzierten Deletionen zu falsch negativen Ergebnissen im Ames-Test. Der V79/HPRT-Test leistet also mehr als der Ames-Test. Es werden Basenpaarsubstitutionen, *frameshift*-Mutationen und größere Deletionen nachgewiesen (Glatt, 1994). Deshalb ist für Basisprüfungen wichtig, daß zusätzlich zum Ames-Test als Genmutationstest ein Test an Säugetierzellkulturen durchgeführt wird.

Folgt man den obigen Anmerkungen zu den Strategien der Mutagenitätsprüfung, würde man sämtliche Substanzen in anderen Testsystemen mit unterschiedlichen Endpunkten erneut prüfen. Vor allem die Induktion von Chromosomenaberrationen *in vitro* ist zunächst an Säugetierzellkulturen abzuklären. Damit wäre eine Basisprüfung vollständig (Madle und Lang, 1993). Die *in vitro* erzielten Ergebnisse in der Gesamtschau würden es mitunter für die vollständige Charakterisierung des genotoxischen Potentials als wichtig erscheinen lassen, Tierexperimente anzuschließen. In der Regel würde dann zunächst ein Chromosomenaberrationstest oder ein Mikrokerntest durchgeführt werden. Positive Befunde an Somazellen würden dazu überleiten, Mutationstests an Keimzellen von Mäusen in Betracht zu ziehen. Befunde zur Mutagenität der Substanzen in peripheren humanen Lymphozyten *in vitro* sollten dann die Grundlage einer Extrapolation der Befunde auf den Menschen, insbesondere der menschlichen Keimzellen, etwa im Sinne der oben skizzierten Theorie nach Sobels sein.

V Experimentelle Einzelheiten

1 Materialien

1.1 Chemikalien und Reagenzien

2-Amino-6-Mercaptopurin (6-Thioguanin; A 4882), Ampicillin (A 6140), 2-Anthramine (A 1381), d-Biotin (B 4501), Bromphenolblau (B 8026), 9,10-Dimethyl-1,2-Benzanthracene (D 3254), Ethidiumbromid (E 8751), D-Glucose-6-Phosphat (G 7879), L-Histidin (H 9511), Kristallviolett (C 0775), Laurylsulfat (SDS, L 4390), Mercapthoethanol (M6250), Methansulfonsäure-Ethylester (EMS, M 0880), Methylenblau (MB1), Mineralöl (M-5904); Minimum Essential Medium Eagle (MEM, M 0643), Natriumazid (S 2002), β -Naphtoflavon (N 3633), β -Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat (N 0505), Phenobarbital-Na (P 5178), Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (P 3803), Tetrazyklin (T 3383), Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA, T 5537; CAS-Nr. 109-16-0) und Xylencyanol (X 4126) wurden von Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Giemsas Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung (9204), Glutaraldehyd (820603), Glyzerin (4094), Methylmethacrylat (MMA, 800590; CAS-Nr. 80-62-6), 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA, 800588; CAS-Nr. 868-77-9), 2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-propan (Bisphenol A, 803546; CAS-Nr. 80-05-7), 2,3-Epoxypropyl-methacrylat (Glycidylmethacrylat, GMA, 800609; CAS-Nr. 106-91-2) kamen von Merck (Darmstadt). 2,2-Bis-4(2-hydroxy-3-methacryloxy-propyloxy)-phenyl-propan (Bis-GMA; CAS-Nr. 1565-94-2) und 7,7,9-(7,9,9-Trimethyl-4,13-dioxo-3,14-dioxa-5,12-diaza-hexadecan-1,16-diol-dimethacrylat (UDMA; CAS-Nr. 72869-86-4) waren von Röhm (Darmstadt). Colcemid-Lösung (472539) und EDTA-Na₂ (11280) kamen von Serva (Heidelberg).

Fötales Kälberserum (10108-074), Penicillin/Streptomycin (15140-114), Trypsin (25090-028), 100 bp DNA-Leiter (15628-019) kamen von Gibco BRL (Eggenstein). Oxoid Nutrient Broth No. 2 war von Oxoid Ltd. (Unipath Ltd, Basingstoke, England), Dimethylsulfoxid von Merck (2931) und Pierce (No. 20684, Rockford, IL, USA). 2,4,7-Trinitro-9-fluorenol (TNF, 92810) kam von Fluka (Neu-Ulm).

Agarose NuSieve (50094) und Agarose Seakem (50004) waren von Biozym (Hess. Oldendorf), die PhiX/Hae III DNA-Längenstandards (201000) von Stratagene (Heidelberg). Nukleotidmischung (27-2094-01) und Rinderserumalbumin (BSA, 27-8914-02) wurden von Pharmacia (Freiburg) bezogen, Taq-DNA-Polymerase (1146 173), Proteinase K (161519) und RNase (109 126) waren von Boehringer (Mannheim).

Alle anderen Chemikalien hatten mindestens p.A.-Qualität und waren von Merck (Darmstadt).

1.2 Lösungen, Medien und Puffer

1.2.1 Lösungen für Zellkultur, Zytotoxizitätstest und HPRT-Test

Minimal Essential Medium (MEM) +10% fötales Kälberserum (FCS) (1 Liter):

9,66 g	MEM-Pulver
2,2 g	NaHCO ₃
100 ml	fötales Kälberserum (FCS)

MEM mit Penicillin/Streptomycin:

10 ml Penicillin/Streptomycin-Stammlösung auf 1 Liter MEM
Endkonzentration: 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin

S9-Mix (10%) für den V79/HPRT-Test (18 ml Gesamtvolumen):

1,8 ml S9-Fraktion + 16,2 ml Kofaktorstofflösung (wie für den Ames-Test, siehe unten)

Selektivmedium für V79/HPRT-Mutanten: 7 µg 6-Thioguanin / ml MEM

9,10 Dimethyl-1,2-Benzanthracen (DMBA) - Stammlösung: 10 mg DMBA/ml DMSO

10X PBS-EDTA (phosphate buffered saline, 1Liter):

80 g	NaCl
2 g	KCl
9,1 g	Na ₂ HPO ₄
2 g	KH ₂ PO ₄
2 g	EDTA-Na ₂

Kristallviolett-Färbelösung: 0,02 g Kristallviolett / 100 ml Wasser

Methylenblau-Lösung: 1 g Methylenblau / Liter 70% EtOH

Trypsinlösung: 100 ml Trypsinlösung (0,1%)

1.2.2 Lösungen für die *Salmonella*-Kulturen und den Ames-Test

Master plate (1 Liter):

15 g	Agar
20 ml	50-faches Vogel-Bonner-Medium
40%	Glucose
0,1 Mol	Histidin-Lösung
0,5 mMol	Biotin-Lösung
3,15 ml	Ampicillin-Lösung

Vollagar (1 Liter):

25 g	Oxoid No. 2
15 g	Agar

Minimal-Glucose-Agar (1 Liter):

15 g	Agar
20 ml	50-faches Vogel-Bonner-Medium
50 ml	40% Glucose

Top-Agar (1 Liter):

6 g	Agar
15 g	NaCl

Oxoid-Nährlösung: 25g / Liter Oxoid No. 2

Biotin-Lösung (0,5 Mol/L):

12,22 mg	Biotin
100 ml	Wasser

Histidin-Lösung (0,1 Mol/L):

2,1 g	Histidin
100 ml	Wasser

Histidin-Biotin-Lösung (0,5 Mol/L):

10,48 mg	Histidin
12,22 mg	Biotin
100 ml	Wasser

Ampicillin-Lösung: 0,8 g Ampicillin auf 100 ml 0,02 M Natronlauge

S9-Mix (10%) für Ames-Test (1 ml): 100 µl S9-Fraktion + 900 µl Kofaktorlösung

50X Vogel-Bonner-Medium E (VB-Salze) (1 Liter):

10 g	MgSO ₄ · 7H ₂ O
91,4 g	Zitronensäure, wasserfrei
500 g	K ₂ HPO ₄
175 g	NaNH ₄ HPO ₄ x 4H ₂ O

Na-Phosphatpuffer (pH 7,4):

81,0 ml	Na ₂ HPO ₄ (0,2 Mol/L)
19,0 ml	NaH ₂ PO ₄ (0,2 Mol/L)

Kofaktorlösung:

20 µl	440 mM MgCl ₂
10 µl	1,65 M KCl
50 µl	110 mM G-6-P
40 µl	110 mM NADP
800 µl	200 mM Na-Phosphatpuffer
80 µl	H ₂ O

Glutaraldehyd 1%:

4 ml	25% Glutaraldehyd
96 ml	H ₂ O

1.3 DNA-Isolierung und Elektrophorese

Tris-EDTA-Puffer (TE):

10 mMol/L	Tris-Cl (pH 8.0)
10 mMol/L	EDTA (pH 8.0)

5X TBE-Puffer (1 Liter):

54 g	Tris
27,5 g	Borsäure
20 ml	0,5 M EDTA (pH 8.0)

Homogenisierungspuffer für die DNA-Extraktion aus V79-UL-Zellen:

100 mMol/L	NaCl
10 mMol/L	Tris-Cl (pH 7.6)
10 mMol/L	EDTA (pH 7.6)
17%	SDS

Proteinase K-Lösung: 10 mg Proteinase K / ml TE-Puffer

RNAse-Lösung: 10 mg RNAse / ml TE-Puffer

3 Mol/L Natriumacetat (pH 5.2): 408g Na-Acetat x 3H₂O auf 1 Liter H₂O

Loading-Buffer für die Agarosegel-Elektrophorese (10 ml):

25 mg	Bromphenolblau
25 mg	Xylencyanol
3 ml	Glyzerin

Ethidiumbromid-Stammlösung: 10 mg / ml Ethidiumbromid in Wasser

Färbelösung für Agarosegele: 0,5 µg / ml Ethidiumbromid in 1X TBE-Puffer

1.4 Primer für die Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Primer zur Amplifizierung der Exonsequenzen des *hprt* Gens aus genomischer DNA der V79-UL Zellen wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen oder am Lehrstuhl für

Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität Regensburg, synthetisiert. Die Sequenzen der Primer und die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente sind in Tabelle 31 gelistet.

Tabelle 31: Primersequenzen für die PCR-Amplifizierung von *hprt* Exonsequenzen der V79-UL-Zellen.

Primer	Sequenz	DNA-Fragment (bp)
Exon 1 forward	5'- GTA CCT GGC CCC AGG AGC CAC C -3	321
Exon 1 reverse	5'- TCC GCT CTG CTG AAG AGT CCC G -3	
Exon 2 forward	5'- AGC TTA TGC TCT GAT TTG AAA TCA GCT G -3	166
Exon 2 reverse	5'- ATT AAG ATC TTA CTT ACC TGT CCA TAA TC -3	
Exon 3 forward	5'- CCG TGA TTT TAT TTT TGT AGG ACT GAA AG -3'	220
Exon 3 reverse	5'- AAT GAA TTA TAC TTA CAC AGT AGC TCT TC -3	
Exon 4 forward	5'- GTG TAT TCA AGA ATA TGC ATG TAA ATG ATG - 3'	191
Exon 4 reverse	5'- CAA GTG AGT GAT TGA AAG CAC AGT TAC - 3	
Exon 5 forward	5'- AAC ATA TGG GTC AAA TAT TCT TTC TAA TAG - 3'	247
Exon 5 reverse	5'- GGC TTA CCT ATA GTA TAC ACT AAG CTG - 3'	
Exon 6 forward	5'- TTA CCA CTT ACC ATT AAA TAC CTC TTT TC - 3'	145
Exon 6 reverse	5'- CTA CTT TAA AAT GGC ATA CAT ACC TTG C - 3'	
Exon 7&8 forward	5'- GTA ATA TTT TGT AAT TAA CAG CTT GCT GG - 3'	423
Exon 7&8 reverse	5'- TCA GTC TGG TCA AAT GAC GAG GTG C - 3'	
Exon 9 forward	5'- CAA TTC TCT AAT GTT GCT CTT ACC TCT C - 3'	734
Exon 9 reverse	5'- CAT GCA GAG TTC TAT AAG AGA CAG TCC - 3'	

1.5 Geräte, Instrumente und einfache Hilfsmittel

Agarose-Gelelektrophorese, Agagel Midi, Biometra (Göttingen)

Begasungsbrutschrank, Typ BB 6220, Heraeus (Hanau)

Begasungsbrutschrank, Typ KB 600 K, Heraeus (Hanau)

Biotek EL 311 Autoreader, Biotek (Burlington, USA)

Gewebekulturplatten, 6-well, strahlensteril, Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg)

Glasflaschen, 100 ml, 200 ml, 500 ml, 1000 ml, Duran, Schott (Bayreuth)

Homogenisator, IKA (Staufen)

Kryobehälter, L'air Liquide (Wiesbaden)

Kulturflaschen (162 cm²), Costar (Bodenheim)

Kulturflaschen (75 cm²), Costar (Bodenheim)

Lichtmikroskop, Diavert, Leitz (Wetzlar)

Magnetrührer, Ikamag Ret (Staufen)

Mikrotiterplatten, 96-well, F-Form, strahlensteril, Greiner (Frickenhausen)

Mikrowellenherd, Sharp (Mannheim)

Petrischalen, strahlensteril, TC 94/16 und TC 145/20, Greiner (Frickenhausen)

Pipetten mit Spitze, steril, 10 ml und 25 ml, Greiner (Frickenhausen)

Pipetten, Gilson, Abimed (Langenfeld)

Pipettierhilfen, Pipet Boy acu und Pipet Boy plus, Tecnomara, Integra (Fernwald)

Präzisionswaage, Typ 1401 MP 8, Sartorius (Göttingen)

Präzisionswaage, Typ MC 210 P, Sartorius (Göttingen)

Reagenzröhrchen (50 ml), 2070, Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg)

Reaktionsgefäße (1 ml), Eppendorf (Hamburg)

Schüttelwasserbad, Typ 1083, GFL Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel)

Schüttler, Typ 3018, GFL Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel)

Sicherheitswerkbank Gelaire, Typ BSB 4, Laminar-Air-Flow, Flow Lab. (Meckenheim)

Spektralphotometer, Typ UV-150-02, Shimazu (Tokyo, Japan)

Spektralphotometer, Uvikon 930, Kontron (Neufahrn)

Standard Power Pack P25, Biometra (Göttingen)

Tischzentrifuge, 5415 C, Eppendorf (Hamburg)

Transferpette-8, Brand (Wertheim)

TRIO-Thermoblock, Biometra (Göttingen)

Ultrazentrifuge TGA 45 (Rotor TFT 45.94), Kontron (Neufahrn)

Varipette, 4710, 2-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, Eppendorf (Hamburg)

Vortex, Heidolph (Kelheim)

Zentrifuge Sorvall RC5 (GSA-Rotor), DuPont (Bad Homburg)

Zentrifuge, Rotixa/P und Rotor-Typ 4210, Hettich (Tuttlingen)

2 Methoden

2.1 Chemische Analyse der Testsubstanzen

Die Reinheit der Testsubstanzen (Kompositmonomere) Bisphenol A-Glycidylmethacrylat (Bis-GMA) und Urethandimethacrylat (UDMA), Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA), Methylmethacrylat (MMA) und 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) sowie der Ausgangssubstanzen Bisphenol A (BPA) und Glycidylmethacrylat (GMA) wurde analysiert. HPLC-Analysen wurden von Diplomchemiker A. Schuster (Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie II, Universität Regensburg), die massenspektroskopischen Analysen von Dr. K. Mayer (Betriebseinheit „Zentrale Analytik“, Nat.-Fak. IV, Universität Regensburg) durchgeführt. Das hier verwendete Bis-GMA enthielt kleinere Fragmente der Reinsubstanz, für alle anderen Substanzen konnten keine Nebenprodukte nachgewiesen werden.

2.2 Präparation einer Mikrosomenfraktion (S9 Fraktion) aus der Rattenleber

Die Mikrosomenfraktion (S9 Fraktion) aus der Rattenleber wurde entweder von uns selbst aus Sprague-Dawley-Ratten (Charles River, Sulzfeld) präpariert oder von der Firma Cytotest Cell Research (CCR, Rossdorf), die Wistar-Ratten verwendet, bezogen. Beide Fraktionen induzierten im Ames-Test dieselben Revertanzahlen nach Prüfung mit 2-Aminoanthracen als positiver Kontrollsubstanz (Maron und Ames, 1983).

Die Induktion von Mikrosomen in der Rattenleber folgte in beiden Fällen einer bekannten Methode (Matsushima *et al.*, 1976). Den Ratten wurden über einen Zeitraum von vier Tagen abwechselnd Phenobarbital-Na und β -Naphthoflavon intraperitoneal gespritzt. Am ersten Tag wurden 30 mg Phenobarbital / kg Ratte, am zweiten Tag 60 mg Phenobarbital, am dritten Tag 60 mg Phenobarbital und 80 mg β -Naphthoflavon und am vierten Tag wiederum 60 mg Phenobarbital verabreicht. Am fünften Tag werden die Ratten getötet. Unmittelbar danach wurden die Lebern mit sterilen Instrumenten entnommen, in eiskalter 150 mM KCl-Lösung

gewaschen und danach auf Eis in kleine Stücke geschnitten. Die Leberstücke wurden im Homogenisator in KCl-Lösung vollständig homogenisiert. Das Homogenat wurde in verschraubbaren Zentrifugenröhrchen (250 ml) 10 min bei 4 °C und 7500 U/min zentrifugiert (Sorvall RC5, GSA-Rotor). Der Überstand, der die Mikrosomenfraktion enthielt, wurde danach bei 35.000 $\times g$ (Ultrazentrifuge TGA 45, Rotor TFT 45.94) gesammelt. Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurde die Mikrosomenfraktion in 150 mM KCl-Lösung in Portionen (1 ml) über mehrere Wochen bei -70 °C gelagert. Der Proteingehalt der Mikrosomenfraktion wurde nach Färbung mit Coomassieblau und Rinderserumalbumin (BSA) als Standardprotein ermittelt (Bradford, 1976). Die Mikrosomenfraktion enthielt üblicherweise etwa 30-35 mg Protein/ml.

2.3 *Salmonella*/Mikrosomen-Test (Ames-Test)

2.3.1 Kultivierung der *Salmonella typhimurium*-Stämme

Die *Salmonella typhimurium*-Stämme TA98, TA97a, TA100 und TA102 stammten aus dem Labor von Prof. Dr. BN Ames (University of California at Berkeley, CA, USA). Bakterienkulturen wurden für jedes Experiment aus einer Einzelkolonie kultiviert. Dazu wurde zunächst ein Aliquot einer bei -70 °C gelagerten Kultur auf einer *master plate* ausgestrichen und bei 37 °C bebrütet. Danach wurden 20 ml einer Oxoid-Lösung mit einer Einzelkolonie der *master plate* beimpft und 6 h bei 37 °C geschüttelt. Aus dieser Kultur wurde erneut ein Aliquot auf einer *master plate* ausgestrichen und 24 h bei 37 °C angezogen. Eine Einzelkolonie dieser *master plate* wurde in 20 ml Oxoid-Lösung bis zu einer Zelldichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml bei 37 °C unter Schütteln vermehrt. Diese Kultur wurde mit 0,09 ml DMSO/ml versetzt und in 1 ml-Aliquots als Arbeitskopien bei -70 °C bis zu ihrer weiteren Verwendung in Experimenten gelagert.

2.3.2 Experimente zur Mutagenität der Kompositmonomere in *Salmonella typhimurium*

Versuchsvorbereitung

Sterile Petrischalen (94 mm Durchmesser) wurden mit etwa 20 ml Minimal-Glucose-Agar oder Vollagar gefüllt und danach für mindestens 2 Tage im Kühlschrank gelagert, vor Versuchsbeginn jedoch auf Raumtemperatur erwärmt. Top-Agar (900 ml) wurde nach dem Autoklavieren auf etwa 45 °C gekühlt und danach auf einem heizbaren Magnetrührer bei dieser Temperatur gehalten; erst dann wurden 100 ml 0,5 mMol/L Histidin-Biotin-Lösung zugesetzt. Die Testsubstanzen (0,1g) wurden in 2 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst; aus diesen Stammlösungen wurden üblicherweise Aliquots von 250 µl (12,5 mg Testsubstanz) bis 5 µl (0,25 mg Testsubstanz) im Test eingesetzt. Je 20 ml Oxoid-Nährlösung wurden mit 0,8 ml einer Arbeitskopie der Stämme *S. typhimurium* TA98, TA97a, TA100 und TA102 beimpft und 4 h bei 37 °C im Schüttelwasserbad bis zu einer Zelldichte von $1-3 \times 10^8$ Zellen/ml inkubiert.

Versuchsdurchführung

Verschiedene Mengen an Testsubstanz wurden zunächst dreifach in sterilen Reagenzgläsern vorgelegt. Danach wurden 100 µl Bakteriensuspension, dann 2 ml Top-Agar zugesetzt. Testsubstanz, Bakterien und Top-Agar wurden kurz auf einem Vortex-Mixer gemischt und anschließend auf Minimal-Glucose-Agar ausplattiert. In den Experimenten, die in Anwesenheit einer Mikrosomenfraktion aus der Rattenleber (S9-Fraktion) durchgeführt wurden, wurden zusätzlich 500 µl eines S9-Mixes (10% S9; 1,25 mg Protein) zugegeben. War die Top-Agarschicht erstarrt, wurden die Platten 3 Tage bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert.

In jedem Experiment wurden zusätzlich zur Anzahl der substanzinduzierten Mutanten auch die Spontanreversionsraten, die Zahl der Lebendkeime und die Zahl der Mutanten bestimmt, die durch positive Kontrollsubstanzen erzeugt wurden. Zur Bestimmung der Zahl spontaner Mutanten wurden lediglich 100 µl Bakteriensuspension in 2 ml Top-Agar ausplattiert. Als positive Kontrollsubstanzen wurden in den Experimenten ohne den Zusatz einer Mikrosomenfraktion für die *S. typhimurium*-Stämme TA97a und TA98 das 2,4,7,-Trinitro-9-

fluorenone in DMSO (0,5 µg/Platte), für TA100 das Natriumazid (10 µg/Platte) und für TA102 0,05% Glutaraldehyd (100 µl/Platte) eingesetzt. 2-Anthramine (Aminoanthracen; 10 µg/Platte) war die positive Kontrollsubstanz für alle Stämme in den Ansätzen mit einer S9-Fraktion.

In jedem Experiment wurde außerdem mit weiteren Kontrollen (Histidinbedarf, *rfa*- und *uvrB*-Mutationen, R-Faktor) die Identität der *S. typhimurium*-Stämme geprüft. Zur Bestimmung des Histidinbedarfs wurden 100 µl einer 0,5 mMol/L Biotin- und einer 0,1 mMol/L Histidin-Lösung auf Minimal-Glucose-Agar aufgetragen. Die für die Mutagenitätsprüfung vorbereitete Bakteriensuspension wurde in 0,9% NaCl 10⁶-fach verdünnt, aus diesem Ansatz wurden 100 µl pro Platte aufgetragen. Die Biotin-Lösung allein fungierte als negative Kontrolle.

Zur Bestimmung der *rfa*-Mutation wurde auf eine mit Bakterien in Top-Agar überschichtete Vollagarplatte ein Filterplättchen mit 10 µl einer 0,1%-igen Kristallviolett-Lösung gelegt. Die UV-Sensitivität der *S. typhimurium*-Stämme wurde ebenfalls auf Vollagarplatten geprüft. Eine Petrischale mit Bakterien in der Top-Agarschicht wurde zur Hälfte mit Aluminiumfolie abgedeckt und anschließend für etwa 10 sec der UV-Strahlung der sterilen Werkbank ausgesetzt. Die Ampicillinresistenz der hier benutzten *S. typhimurium*-Stämme zeigt an, daß der R-Faktor auf dem Plasmid pKM101 vorhanden ist. Um diese zu prüfen, wurde ein Ampicillinplättchen auf eine Vollagarplatte mit Bakterien in Top-Agar aufgebracht.

Versuchsauswertung

Die *S. typhimurium*-Kolonien auf den Agarplatten wurden mit einem Koloniezählgerät (Artec AccuCount) bestimmt. Zur Beurteilung eines reproduzierbaren und dosisabhängigen mutagenen Effektes einer Testsubstanz wurde die Zahl der substanzinduzierten Revertanten verglichen mit der Zahl der spontanen Revertanten und der Zahl der Mutanten auf Platten, auf die das Lösungsmittel aufgetragen wurde. Wichtig war hier, den toxischen Konzentrationsbereich einer Prüfsubstanz zu kennen. Ein gesunder Hintergrundrasen auf den Agarplatten der spontanen Revertanten besteht aus vielen sehr kleinen, gleich großen und gleichmäßig verteilten Bakterienkolonien, die nur im Mikroskop sichtbar sind. Die geprüfte Menge einer Testsubstanz war toxisch, wenn die Zahl der Kolonien des Hintergrundrasens auf

Testplatten im Vergleich zu derjenigen auf den Platten zur Ermittlung der Spontanreversion deutlich geringer oder gar nicht vorhanden war.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Routinekultur der V79-Zellen

Zwei V79-Zelllinien (V79B und V79-UL) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. G. Speit, (Medizinische Genetik, Universität Ulm) zur Verfügung gestellt. Die adherent wachsenden Zellen wurden routinemäßig in Minimum Essential Medium mit 10% fötalem Kälberserum und Penicillin/Streptomycin (100 U/ml und 100 µg/ml) bei 37 °C und 5% CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert. Die Zellen wurden subkultiviert, sobald ein subkonfluent Monolayer gewachsen war. Aus dieser Routinekultur wurden portionsweise 1x10⁶ Zellen/ml in 1 ml Zellkulturmedium mit 10% DMSO in Kryoröhrchen nach Routinemethoden eingefroren und über flüssigem Stickstoff über Wochen gelagert, so daß für sämtliche Experimente (Mutagenitätsprüfungen und Exonscreening mit PCR, vgl. unten) auf Zellen derselben Passage zurückgegriffen werden konnten.

2.4.2 Zytotoxizität der Kompositmonomere

Stammlösungen der Kompositmonomere mit einer Konzentration von 1M wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) angesetzt; für TEGDMA und HEMA wurden zusätzlich Experimente mit wäßrigen Lösungen der Substanzen durchgeführt. Aus diesen Stammlösungen wurden in einer Verdünnungsreihe, die mit Zellkulturmedium (MEM + 10% FCS) angesetzt wurde, üblicherweise acht verschiedene Konzentrationen je Substanz eingestellt und deren Zytotoxizität wie unten beschrieben geprüft.

Durchführung der Zytotoxizitätstests

V79-Zellen (V79B) aus der Routinekultur subkonfluenten Monolayer wurden, nachdem das Kulturmedium entfernt war, mit 8 ml PBS-EDTA gewaschen und nach Trypsinbehandlung in Kulturmedium aufgenommen. Die Zellzahl wurde auf 1.25×10^4 /ml eingestellt, davon wurden je 200 µl mit einer 8-Kanalpipette in die Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und 24 h bei 37°C und 100% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (5% CO₂) inkubiert. Danach wurde das Kulturmedium durch die jeweiligen in Medium gelösten Testsubstanzen in einem Volumen von 200 µl/Well ersetzt. Die Zellen wurden den Testsubstanzen 24h unter den üblichen Kulturbedingungen exponiert. Jede Konzentration wurde pro Versuch in acht Ansätzen getestet; die Exposition wurde durch einfaches Entfernen des Mediums beendet, die Zellen mit 200 µl PBS gewaschen und in 100 µl 1% Glutaraldehyd-Lösung (in Wasser) für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurde die Glutaraldehyd-Lösung abgekippt, die Zellen wurden mit 200 µl PBS gewaschen und bis zur weiteren Aufarbeitung unter 200 µl PBS im Kühlschrank gelagert. Jede Substanz wurde in drei voneinander unabhängigen Versuchen getestet.

Kristallviolett-Assay

Das Protokoll für die Durchführung des Kristallviolett-Assays wurde nach Literaturangaben erstellt (Flick und Gifford, 1984; Gilles *et al.*, 1986; Kueng *et al.*, 1989; Fox *et al.*, 1992). Die Zellen wurden nach dem Abkippen des PBS mit 150 µl 0,02% wässriger Kristallviolett-Lösung für 15 min bei RT gefärbt. Die Färbelösung wurde danach abgekippt und die Wells der Mikrotiterplatte wurden unter laufendem Leitungswasser gewaschen, um ungebundenes Kristallviolett zu entfernen. Gebundenes Kristallviolett wurde mit 180 µl 70% Ethanol nach etwa 3 h Schütteln (Schüttler 3018, GFL Gesellschaft für Labortechnik) gelöst. Die optischen Dichten der Lösungen wurden mit einem Plattenphotometer (Biotek EL 311 Autoreader) bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Die Originalmeßwerte wurden zunächst auf einen Rechner (Olivetti M24) übertragen und anschließend mit einem laboreigenen Rechenprogramm (Dr. K.-A. Hiller, Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie) für das Kurvenfitprogramm Table CurveTM (Jandel Scientific) vorbereitet. Über die Kurvengleichungen der gefitteten Dosis-

Reaktionskurven von drei voneinander unabhängigen Versuchen wurden die TC50-Werte für jede Testsubstanz ermittelt.

2.5 HPRT-Test

2.5.1 HPRT-Test ohne Zusatz einer Mikrosomenfraktion (24 Stunden Exposition)

Der zeitliche Ablauf des HPRT-Tests ist in Abbildung 9 schematisch dargestellt. Die V79-Zellen (V79B) aus einem subkonfluenten Monolayer der Routinekultur werden in einen sterilen 100 ml Erlenmeyerkolben überführt und mit einem Magnetrührer in Suspension gehalten. Aus dieser Zellsuspension wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen in 30 ml MEM mit 10% FCS in einer 145 mm^2 Kulturschale ausgesät. Die Zellen werden etwa 18 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Danach (2. Versuchstag) wurde das Kulturmedium durch die Testsubstanzen, die erst in Dimethylsulfoxid gelöst (1 Mol/L) und danach in Zellkulturmedium verdünnt wurden, ersetzt (Beginn der Exposition). Nach 24 h wurde die Exposition nach visueller Kontrolle der Kulturen im Lichtmikroskop durch einen Mediumwechsel beendet. 24 h später wurden die Zellen erstmals subkultiviert; in der Regel wurden 3×10^6 Zellen pro 145^2 mm Kulturschale erneut ausgesät. Der Zeitpunkt der ersten Subkultivierung 24 h nach dem Ende der Exposition wurde auch gewählt, um die akute Zytotoxizität der Testsubstanzen im HPRT-Test zu ermitteln. Zum einen wurden dazu nur die absolute Zellzahl der Kulturen durch einfaches Zählen (Hämocytometer) ermittelt; sie lag für die unbehandelten Kulturen in der Regel bei $3\text{-}7 \times 10^7$ Zellen/Platte. Zum anderen wurde für die Bestimmung der "*plating efficiency*" (PE1) pro Konzentration einer Testsubstanz je 3 Wells in 6-Well-Platten mit je 4 ml Medium gefüllt und mit 300 Zellen/Well beschickt.

Bis zum Beginn der Selektion von HPRT-Mutanten am zehnten Versuchstag wurde üblicherweise noch zweimal subkultiviert. Zur Selektion von HPRT-Mutanten wurden 6×10^6 Zellen je Konzentration einer Testsubstanz verwendet; sie wurden auf drei 145 mm^2 Kulturschalen in 30 ml Selektionsmedium, das 7 $\mu\text{g/ml}$ 6-Thioguanin enthielt, ausgesät. Für die

Bestimmung der Zahl koloniebildender Zellen zum Zeitpunkt der Mutantenselektion (*cloning efficiency*, PE2) wurden wie für die Ermittlung der *plating efficiency* (PE1) je Konzentration einer Testsubstanz je dreimal 300 Zellen in 6-Well-Platten ausgesät. Jede Konzentration einer Testsubstanz wurde pro Versuch in einer Zellkultur getestet. Jede Substanz wurde in mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen geprüft. Als positive Kontrollsubstanz wurde Methansulfonsäure-Ethylester (Ethylmethansulfonat, EMS) in einer Konzentration von 200 µg / ml eingesetzt (Bradley *et al.*, 1981; Branda und Blickensderfer, 1993). Die Färbung der HPRT-Mutanten und die Bestimmung von *plating efficiency* und *cloning efficiency* ist nachfolgend beschrieben.

2.5.2 HPRT-Test mit und ohne Mikrosomenfraktion (4 Stunden Exposition)

Für die Durchführung des HPRT-Tests mit Aliquots einer Mikrosomenfraktion aus der Rattenleber (S9) wurden das Expositionsmedium und die Menge des Expositionsmediums im Vergleich zu 7.2.4.1 geändert; außerdem wurde die Expositionsdauer auf 4 h reduziert. Es wurden 1.5×10^6 Zellen in 30 ml MEM mit 10% FBS in einer 145 mm Kulturschale ausgesät. Nach etwa 18 h (2. Versuchstag) wurde das Zellkulturmedium durch 18 ml S9-Mix mit Testsubstanz oder nur mit PBS und Testsubstanz (ohne S9) ersetzt. Die V79-Zellen (V79B) wurden der Testsubstanz 4 h bei 37°C exponiert. Nach der Exposition wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, danach wurden 30 ml MEM mit 10% FCS zugegeben. Die anschließenden Subkultivierungen und das Selektionsverfahren erfolgten wie oben für die Ansätze ohne den Zusatz einer Mikrosomenfraktion (24 h Exposition) beschrieben. Jede Konzentration einer Testsubstanz wurde pro Versuch in einer Zellkultur getestet. Jede Substanz wurde in mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen geprüft. Als positive Kontrollsubstanz in den Ansätzen mit Mikrosomenfraktion wurde 9,10 Dimethyl-1,2-Benzanthracen (DMBA) verwendet. Es wurde zunächst eine Dosis-Reaktionskurve erstellt, danach wurde in Mutagenitätsexperimenten eine Konzentration von 20 µg DMBA/ml eingesetzt (Bradley *et al.*, 1981; Glatt, 1993).

Ermittlung der "plating efficiency" und der "cloning efficiency"

Die Zellkolonien zur Ermittlung der *plating efficiency* (PE1) und der *cloning efficiency* (PE2) wurden am 12. (PE1) und am 18. (PE2) Tag nach Versuchsbeginn gefärbt. Das Medium wurde entfernt, die Zellen wurden mit 4 ml PBS/EDTA gewaschen. Die Zellkolonien wurden danach in 4 ml 1% wäßriger Glutaraldehyd-Lösung in PBS 30 min fixiert. Anschließend wurden die Zellkolonien mit 4 ml 0,1% Methylenblau (in 70% Ethanol) 30 min gefärbt. Ungebundener Farbstoff wurde unter laufendem Leitungswasser ausgewaschen. Die fixierten und gefärbten Kolonien wurden an der Luft getrocknet und danach gezählt.

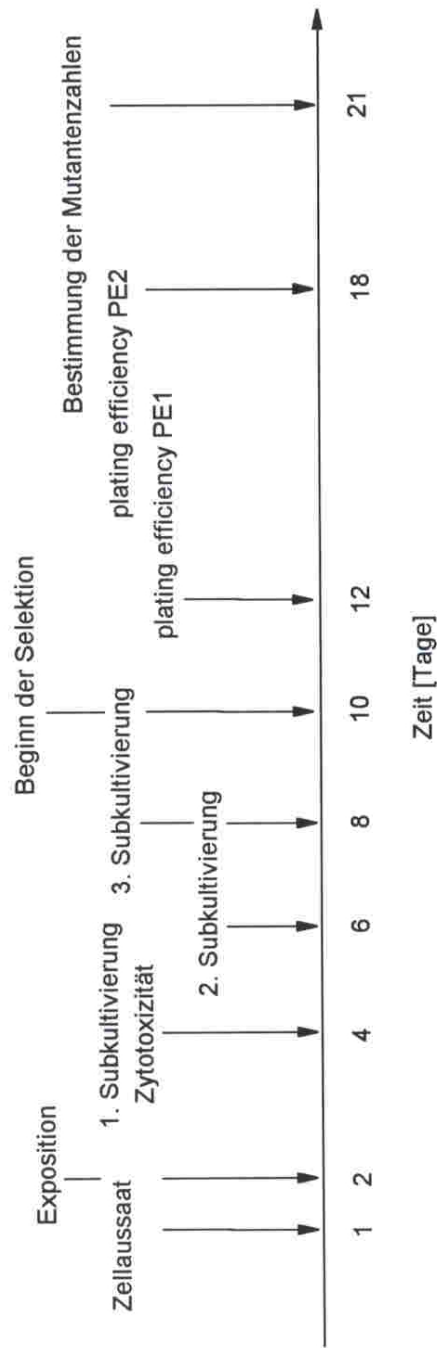
Färben der HPRT-Mutanten

Die Zahl der HPRT-Mutanten wurde üblicherweise am 21. Tag nach Versuchsbeginn ermittelt. Das Kulturmedium wurde von den Kulturschalen entfernt, diese unter laufendem Leitungswasser gewaschen und an der Luft getrocknet. Die Zellkolonien wurden dann mit 10 ml einer 0,1% Methylenblau-Lösung (in 70 % EtOH) 30 min gefärbt. Die Farbstofflösung wurde abgekippt, der überschüssige Farbstoff wurde unter laufendem Leitungswasser ausgewaschen. Anschließend wurden die blau gefärbten Kolonien an der Luft getrocknet und dann gezählt.

Die Berechnung der Mutantenhäufigkeit

Zur Bestimmung der Mutantenhäufigkeit (MF) oder Mutantenrate pro 10^6 Zellen wurde die Zahl der koloniebildenden V79-Zellen (PE2) zur absoluten Zahl von V79-Mutanten in insgesamt 6×10^6 ausgesäten Zellen ins Verhältnis gesetzt und nach folgender einfacher Formel bestimmt:

$$\text{MF} = \frac{\text{absolute Zahl HPRT-defizienter Zellen}}{\frac{\text{Zahl koloniebildender Zellen}}{300} \times \text{Gesamtzahl ausgesäter Zellen}}$$



2.6 Isolierung spontaner und TEGDMA-induzierter HPRT-defizienter V79-UL-Zellklone

Für die Isolierung spontaner und TEGDMA-induzierter HPRT-defizienter V79-UL-Zellklone wurde ein Mutagenitätsexperiment ohne den Zusatz einer Mikrosomenfraktion, wie oben beschrieben, durchgeführt. Die V79-UL-Zellen wurden dem TEGDMA für 4 h exponiert. In Parallelansätzen wurden mehrere Ansätze unbehandelter Zellkulturen und TEGDMA-behandelte (1 mMol/L) Kulturen verwendet. Ein Ansatz wurde, wie üblich, zur Bestimmung der Mutantenhäufigkeit verwendet. In den Ansätzen, aus denen heraus spontane und TEGDMA-induzierte Mutanten isoliert wurden, wurde etwas anders verfahren. Es wurde jeweils nur eine Platte pro unbehandelter oder TEGDMA-behandelter (1 mMol/L) Kultur subkultiviert und anschließend dem Selektionsmedium exponiert, um sicherzustellen, daß unabhängige HPRT-Mutanten isoliert wurden. Aus insgesamt 25 Parallelansätzen (25 unabhängige Zellkulturen) sowohl für die Isolierung spontaner als auch TEGDMA-induzierter Mutanten wurde jeweils nur eine 6-Thioguanin resistente Zellkolonie abgenommen. Eine zweite Zellkolonie auf derselben Platte wurde als *back up* gelagert. Für die Isolierung der Klone wurden die 6-Thioguanin-resistenten Kolonien nicht gefärbt, sondern nach dem Entfernen des Kulturmediums zunächst mit PBS gewaschen. Danach wurde eine Kolonie mit einer sterilen Platinöse abgenommen, in eine Kulturflasche (75 cm²) überführt und unter den üblichen Kulturbedingungen in MEM inkubiert. Nach sieben bis zehn Tagen wurden die Zellen des Klon nach Trypsinieren gesammelt und in einer größeren Kulturflasche (162 cm²) vermehrt. Die Zellen eines subkonfluenten Monolayers wurden danach geerntet und in Aliquots von 2 Millionen Zellen/Kryoröhrchen über flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung, beispielsweise der Isolierung genomischer DNA aus diesen Zellen, gelagert.

2.7 Analyse TEGDMA-induzierter V79-UL-Mutanten mit Polymerase Chain Reaction

2.7.1 Isolierung genomischer DNA aus spontanen und TEGDMA-induzierten V79-UL-Mutanten

Die isolierten und gelagerten spontanen und TEGDMA-induzierten, HPRT-defizienten V79-UL-Zellklone wurden wieder unter Standardbedingungen in großen Kulturflaschen (162 cm²) in Kultur genommen. War die Zellkultur bis zur Konfluenz angewachsen, wurde das Kulturmedium entfernt, der Zellmonolayer mit PBS gewaschen und danach für etwa 30 sec mit Trypsinlösung behandelt. Die Zellen wurden in 30 ml PBS geerntet, in Zentrifugenröhrchen überführt (Falcon, 50 ml) und nach 5 min bei 1000 U/min (Rotixa/P, Hettich) gesammelt. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in etwa 40 ml PBS resuspendiert. Nachdem die Zellzahl bestimmt war, wurde die Zellsuspension nochmals zentrifugiert. Danach wurden etwa 10⁸ Zellen des Zellpellets in 980 µl Homogenisierungspuffer + 20 µl Proteinase K-Lösung für mindestens 3 h, gelegentlich über Nacht, bei 50 °C inkubiert. Anschließend wurde mit demselben Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt und bei 2700 U/min für 10 min zentrifugiert (Rotixa/P, Hettich). Die Phenolextraktion wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Anschließend wurde die wäßrige Phase für 1h mit 100 µg/ml RNAse und 100 µg/ml Proteinase K bei 37°C inkubiert.

Nach Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (10 ml) und Chloroform/Isoamylalkohol (10 ml) wurde die DNA mit 1/10 Volumenteil 3M Natriumacetat (pH 5.2) und 2 Volumenteilen 100% EtOH gefällt und bei 3500 U/min (Rotixa/P, Hettich) zentrifugiert. Die DNA wurde zweimal mit 70 % Ethanol und einmal mit 100 % Ethanol gewaschen, als Pellet getrocknet oder mit einem Glasstab in ein frisches Röhrchen überführt und dann über Nacht bei Raumtemperatur im offenen Röhrchen getrocknet. Die DNA wurde danach in 1-5 ml TE-Puffer resuspendiert und im Kühlschrank gelagert. Konzentration und Reinheit der isolierten DNA wurden spektralphotometrisch bei Wellenlängen von 260 und 280 nm bestimmt. Dabei entspricht 1

OD₂₆₀ einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml, das Verhältnis der Extinktionswerte OD₂₆₀/OD₂₈₀ liegt für reine DNA bei 1,8 (Sambrook *et al.*, 1989).

2.7.2 Durchführung der PCR-Analysen

Die molekulare Analyse spontaner und TEGDMA-induzierter HPRT-defizienter V79-UL-Zellklone wurde mit polymerase chain reaction (PCR) durchgeführt. Dazu wurden die Sequenzen der Exons 1 bis 9 in separaten Reaktionen amplifiziert und nicht in einer Multiplex-PCR, wie beschrieben (Rossiter *et al.*, 1991). Es war nämlich in Vorversuchen trotz mannigfaltiger Variation der Versuchsbedingungen nicht in jedem einzelnen Experiment gelungen, alle Exonsequenzen mit DNA aus HPRT-profizienten V79-UL-Wildtyp-Zellen als positiver Kontrolle in einem Reaktionsansatz gleichzeitig reproduzierbar zu amplifizieren.

Die Reaktionsmische für die Amplifizierung der einzelnen Exonsequenzen unterschieden sich lediglich in der MgCl₂-Konzentration, das Temperaturprofil des Reaktionszyklus war für alle Reaktionen dasselbe (Tabelle 32). Die Primer für die Amplifizierung der einzelnen Exons wurden in verschiedenen Mengen in einem Volumen von 1 µl zugesetzt. Für die Amplifizierung der Exonsequenzen 3, 4, 5 und 9 wurden jeweils 10 pMol der entsprechenden Primerpaare eingesetzt. Die Exon 1- Sequenzen wurden mit je 3 pMol, Exon 2 mit 15 pMol, Exon 6 mit 20 pMol und die Exons 7&8 mit je 7,5 pMol der Primerpaare amplifiziert. Sämtliche Reaktionen wurden mit etwa 100 ng genomischer DNA aus V79-UL-Klonen durchgeführt. In mindestens einem Wiederholungsexperiment wurden in allen Ansätzen, in denen keine Exonsequenzen amplifiziert wurden, auch 500 ng DNA eingesetzt. Die Reaktionen wurden mit einem Gesamtvolumen von 50 µl in 500 µl Reaktionsgefäßen in einem TRIO-Thermoblock (Biometra) durchgeführt. Die PCR-Ansätze wurden vor dem Start der Reaktion mit Mineralöl überschichtet und danach mindestens für 5 min bei 94 °C inkubiert. Danach wurden 36 Reaktionszyklen mit folgendem Temperaturprofil vervollständigt: 94 °C für 1 min, 48 °C für 1 min und 45 sec, 72 °C für 2 min. Nach den PCR-Zyklen wurden die Reaktionsansätze zunächst für 10 min auf 72 °C

gehalten und danach auf 4 °C gekühlt. Jedes PCR-Experiment wurde mit Positiv- (DNA aus V79-Wildtyp-Zellen) und Negativkontrollen (ohne DNA) durch-geführt.

Tabelle 32: Reaktionsmische für die PCR-Amplifizierung von *hprt*-Exonsequenzen der V79-UL-Zellen. *) im Wiederholungsexperiment wurden 500 ng DNA eingesetzt.

Substanzen	<i>hprt</i> -Exonsequenzen		
	2, 3, 4, 5, 7&8, 9	1	6
Tris-Cl, pH 8,8	67 mMol/L	67 mMol/L	67 mMol/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	16,6 mMol/L	16,6 mMol/L	16,6 mMol/L
MgCl ₆ x 6 H ₂ O	4 mMol/L	3 mMol/L	5 mMol/L
dNTP	1,5 mMol/L	1,5 mMol/L	1,5 mMol/L
DMSO	10%	10%	10%
BSA	2,83 mg/ml	2,83 mg/ml	2,83 mg/ml
DNA	100 ng*	100 ng*	100 ng*
H ₂ O	ad 49 µl	ad 49 µl	ad 49 µl
Taq Polymerase (1U)	1 µl	1 µl	1 µl

2.7.3 Gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten *hprt*-Exonsequenzen

PCR-Produkte in 15-25 µl des Gesamtansatzes (50 µl) wurden anschließend elektrophoretisch in einem 4% NuSieve-Agarosegel in 1X TBE-Puffer bei 8 V/cm aufgetrennt (Standard Power Pack P25, Biometra).

HPRT-defiziente spontane oder TEGDMA-induzierte V79-UL-Zellklone wurden aufgrund des Musters der amplifizierten Exonsequenzen in drei Gruppen eingeteilt:

- Wildtypmuster: Sämtliche Exonsequenzen wurden ohne erkennbare kleinere und größere Insertionen oder Deletionen amplifiziert.

- Partialdeletion: Es fehlt die Sequenz eines Exons oder es sind mehrere Exonsequenzen in einem HPRT-defizienten Zellklon deletiert.
- Totaldeletion: Es fehlen alle Exonsequenzen in einem HPRT-defizienten Zellklon.

In keinem PCR-Ansatz der insgesamt 50 isolierten und analysierten HPRT-defizienten Zellklone wurden kleinere intraexonische Insertionen oder Deletionen festgestellt.

VI Zusammenfassung

Kompositfüllungswerkstoffe werden hauptsächlich aus ästhetischen Gründen im Frontzahnbereich, in letzter Zeit zunehmend für bestimmte Indikationen auch im Seitenzahnbereich verwendet. Neben Kriterien der Verarbeitung oder der Haltbarkeit ist auch die Gewebeverträglichkeit für den klinischen Erfolg eines zahnärztlichen Komposits bedeutsam. Die Fähigkeit von Substanzen oder Werkstoffen, die Erbmasse von Organismen aufgrund induzierter Mutationen bleibend zu verändern, ist dabei ein Aspekt der Gewebeverträglichkeit, der analysiert wird. Die heute üblicherweise verwendeten zahnärztlichen Komposite basieren größtenteils auf verschiedenen Methacrylaten, deren Mutagenität in der verfügbaren Literatur bisher nicht beschrieben ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb zunächst die Zytotoxizität der beiden Basismonomere zahnärztlicher Komposite, Bisphenol A-Glycidylmethacrylat (Bis-GMA) und Urethandimethacrylat (UDMA), des wichtigsten Comonomers Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA), der beiden Monomere Methylmethacrylat (MMA) und 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) und der Ausgangssubstanzen zur Synthese des Bis-GMA, Glycidylmethacrylat (GMA) und Bisphenol A (BPA) in V79-Zellen ermittelt, um den für Mutagenitätsexperimente relevanten Konzentrationsbereich einzugrenzen. Auf dieser Basis wurden mutagene Effekte der Substanzen *in vitro* geprüft und quantifiziert. Es wurden dazu zwei verschiedene Genmutationstests verwendet. Der *Salmonella*/Mikrosomen-Test (Ames-Test) wurde mit verschiedenen *Salmonella typhimurium*-Stämmen durchgeführt, die induzierte Basenpaar-substitutionen und *frameshift*-Mutationen in GC- und in AT-reichen DNA-Abschnitten erkennen. Der V79/HPRT Test ist ein Testsystem mit Säugetierzellen (V79) und zeigt substanzinduzierte Punktmutationen, Insertionen und große Deletionen von Nukleotidsequenzen auf.

Die Basismonomere Bisphenol A-Glycidylmethacrylat (Bis-GMA) und Urethandimethacrylat (UDMA), das Monomer 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) und Bisphenol A waren im Ames-Test und im V79/HPRT-Test nicht mutagen. Glycidylmethacrylat und Triethylenglycoldimethacrylat hingegen induzierten Genmutationen bei direkter Prüfung. Glycidylmethacrylat bewirkte einen 2-3-fachen Anstieg der Mutantenzahlen in *S. typhimurium* TA97a und TA102, im Stamm TA100 stiegen die Mutantenzahlen sogar um den Faktor 8. In Gegenwart einer metabolisch aktiven Mikrosomenfraktion aus der Rattenleber (S9) war der mutagene Effekt noch etwas stärker und auch der Stamm TA98 reagierte mit erhöhten Mutantenraten. GMA war auch in V79-Zellen mutagen. Die Mutantenfrequenz in GMA-behandelten V79-Zellkulturen stieg um mehr als den Faktor 10 über diejenige unbehandelter Zellkulturen nach einer Exposition von 24 Stunden. Dieser Effekt war nach einer kürzeren Expositionszeit (4 Stunden) geringer und wurde in Anwesenheit einer S9-Fraktion vollständig aufgehoben. Möglicherweise wurde GMA durch eine membrangebundene Esteraseaktivität gespalten, wobei Methacrylat und Glycidol entstanden. Glycidol könnte dann die hohen Mutantenzahlen im Ames-Test in Anwesenheit der S9-Fraktion induziert haben. Im HPRT-Test reduzierte wahrscheinlich eine Epoxidhydrolase-Aktivität das Glycidol zu Glycerin, das nicht mutagen ist. Man darf wegen der hohen Mutantenzahlen in *S. typhimurium* TA100 annehmen, daß GMA überwiegend Basenpaarsubstitutionen in GC-reichen DNA-Abschnitten induzierte. TEGDMA war im V79/HPRT-Test bei direkter Prüfung mutagen. In Anwesenheit von S9 wurde es wahrscheinlich durch eine Esteraseaktivität zu Methacrylsäure und Triethylenglycoldimethacrylat gespalten.

Ein Deletionsscreening kodierender Exonsequenzen des *hprt*-Gens mit Polymerase Chain Reaction eröffnete Einblicke in das TEGDMA-induzierte Mutationsspektrum. In 19 von insgesamt 25 analysierten Mutanten der Zelllinie V79-UL waren keine Exonsequenzen nachzuweisen (Totaldeletionen), 5 Mutanten wiesen Partialdeletionen auf und lediglich ein Zellklon besaß das Wildtypmuster des *hprt*-Gens. Es wurden in keiner der spontan entstandenen V79-Mutanten Deletionen gefunden. Es ist zu vermuten, daß TEGDMA im Sinne

einer Michael-Addition mit Purinbasen doppelsträngiger DNA reagierte und crosslinks ausbildete. Für die Substanzklasse der Acrylate wurden bisher keine molekularen Analysen induzierter Mutationsspektren publiziert. Es ist daher gegenwärtig nicht zu entscheiden, ob diese Substanzklasse ausschließlich Deletionen von Nukleotidsequenzen verursacht oder ob auch die Induktion von Punktmutationen möglich ist.

Die Verwendung der beiden Genmutationstests führte zu einer Einschätzung des mutagenen Potentials der Kompositmonomere *in vitro* und der Formulierung einer Strategie für die Prüfung zahnärztlicher Werkstoffe allgemein. TEGDMA induzierte falsch negative Ergebnisse im Ames-Test. Dies bedeutet, daß eine rationelle Prüfung der Mutagenität zahnärztlicher Werkstoffe allgemein einen Test einschließen muß, der substanzinduzierte Deletionen aufzeigt. Deletionen entstehen in Folge von DNA-Doppelstrangbrüchen. Weil DNA-Doppelstrangbrüche auch die Voraussetzung für die Entstehung von Chromosomen-aberrationen sind, erscheint es notwendig, zu prüfen, ob TEGDMA und möglicherweise andere Kompositmonomere im besonderen und zahnärztliche Werkstoffe im allgemeinen Chromosomenaberrationen *in vitro* verursachen. Möglicherweise werden für eine endgültige Einschätzung des mutagenen Potentials einer Substanz abschließend Tests *in vivo* notwendig.

VII Literaturverzeichnis

- Aaron CS, Bolcsfoldi G, Glatt H-R, Moore M, Nishi Y, Stankowski L, Theiss J, Thompson E (1994) International workshop on standardization of genotoxicity test procedures: Mammalian cell gene mutation assays working group report. *Mutation Res*, 312, 235-239.
- Aghamohammadi SZ, Morris TM, Stevens DL, Thacker J (1992) Rapid screening for deletion mutations in the hprt gene using the polymerase chain reaction: X-ray and α -particle mutant spectra. *Mutation Res*, 269, 1-7.
- Agner T, Menne T (1994) Sensitization to acrylates in a dental patient. *Contact Dermatitis*, 30, 249-250.
- Aguirrezabalaga I, Nivard MJM, Comendador MA, Vogel EW (1995) Hexamethylmelanine is a potent inducer of deletions in male germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Carcinogenesis*, 16, 2679-2683.
- Alanko K, Kanerva L, Jolanki R, Kannas L, Estlander T (1996) Oral mucosal diseases investigated by patch testing with a dental screening series. *Contact Dermatitis*, 34, 263-267.
- Albertini AM, Hofer M, Calos MP, Miller JH (1982) On the formation of spontaneous deletions: the importance of short sequence homologies in the generation of large deletions. *Cell*, 29, 319-328.
- Al-Fawaz A, Gerzina TM, Hume WR (1993) Movement of resin cement components through acid-treated dentin during crown cementation. *J Endodon*, 19, 219-223.
- Ames BN, Lee FD, Durston WE (1973) An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 70, 782-786.
- Andersen M; Kiel P, Larsen H, Maxild J (1978) Mutagenic action of aromatic epoxy resins. *Nature*, 276, 391-392.
- Andrews LS, Clary JJ (1986) Review of the toxicity of multifunctional acrylates. *J Toxicol Environ Health*, 19, 149-164.

- Antonucci JM Toth EE (1983) Extent of polymerization of dental resins by differential scanning calorimetry. *J Dent Res*, 62, 121-125.
- Arima T, Nikawa H, Hamada T, Harsini (1996) Composition and effect of denture base resin surface primers for reline acrylic resins. *J Prosthet Dent*, 75, 457-462.
- Arnold SF, Klotz DM, Collins BM, Vonier PM, Giullette LJ, McLachlan JA (1996b) Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals. *Science*, 272, 1489-1492.
- Arnold SF, Robinson MK, Notides AC, Giullette LJ Jr, McLachlan JA (1996a) A yeast estrogen screen for examining the relative exposure to cells to natural and xenoestrogens. *Environ Health Perspect*, 104, 544-548.
- Ashby J (1986) The prospects for a simplified and internationally harmonized approach to the detection of possible human carcinogens and mutagens. *Mutagenesis*, 1, 3-16.
- Ashby J (1989) Origins of current uncertainties in carcinogen/mutagen screening. *Environ Mol Mutagen*, 14 (Suppl. 16), 51-59.
- Ashby J, Lefevre PA, Odum J, Harris CA, Routledge EJ, Sumpter JP (1997) Synergy between synthetic estrogens. *Nature*, 385, 494.
- Ashby JJ, Purchase IFH (1993) Will all chemicals be carcinogenic to rodents when adequately evaluated? *Mutagenesis*, 8, 489-493.
- Ashby J, Tennant RW (1988) Chemical structure, Salmonella mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogens among 222 chemicals tested in rodents by the U.S NCI/NTP. *Mutation Res*, 204, 17-115.
- Ashby J, Tennant RW (1991) Definitive relationship among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity of 301 chemicals tested by the U.S. NTP. *Mutation Res*, 257, 229-306.
- Ashby J, Waters MD, Preston J, Adler ID, Douglas GR, Fielder R, Shelby MD, Anderson D, Sofuni T, Gopalan HNB, Becking G, Sonich-Mullin C (1996) IPCS harmonization of methods for the prediction and quantification on human carcinogens. *Mutation Res*, 352, 153-157.

- Asmussen E (1982) Factors affecting the quantity of remaining double bonds in restorative resin polymers. *Scan J Dent Res*, 90, 490-496.
- Athas WF, Gutzke GE, Kubinski ZO, Kubinski H (1979) In vitro studies on the carcinogenic potentials of orthodontic bonding materials. *Ecotoxicol Environ Safety*, 3, 401-410.
- Atkinson A, Roy D (1995a) In vitro conversion of environmental estrogenic chemical bisphenol A to DNA binding metabolites(s). *Biochem Biophys Res Commun*, 210, 424-433.
- Atkinson A, Roy D (1995b) In vivo DNA adduct formation by bisphenol A. *Environ Mol Mutagen*, 26, 60-66.
- Autian J (1975) Structure-toxicity relationship of acrylic monomers. *Environ Health Perspect*, 11, 141-152.
- Auvenshine RC, Eames WB (1972) Pulpal response of monkeys to modifications of a bisphenol A composite resin and cement. *J Dent Res*, 51, 1062-1066.
- Baker S, Brooks SC, Walker DM (1988) The release of residual monomeric methyl methacrylate from acrylic appliances in the human mouth: An assay for monomer in saliva. *J Dent Res*, 67, 1295-1299.
- Barry JM, Draughn RA, Jacobsen N (1996) Adverse biomaterials reactions among dental personnel and dental patients. *J Dent Res*, 75, 329 (2495).
- Bauer JG, Al-Rubayi A (1987) Tissue response to direct filling materials. *J Prosthet Dent*, 58, 584-589.
- Bayne SC (1992) Dental composites/glass ionomers: Clinical reports. *Adv Dent Res*, 6, 65-77.
- Bean TA, Tong PY, Phillips, Eick JD, Yourtee DM (1996) Cholesterol esterase degradation of a series of ten methacrylate monomers. *J Dent Res*, 75, 381 (2912).
- Bean TA, Williams DL (1997) The enzymatic hydrolysis of bisphenol A dimethacrylate. *J Dent Res*, 76, 327 (2506).
- Benigni R, Giuliani A (1988) Predicting carcinogenicity with short-term tests: biological models and operational approaches. *Mutation Res*, 205, 227-236.

- Bentley P, Bieri P, Kuster H, Muakkassah-Kelly, Sagelsdorf P, Staubli W, Waechter F (1989) Hydrolysis of bisphenol A diglycidylether by epoxide hydrolases in cytosolic and microsomal fractions of mouse liver and skin: inhibition by bis epoxycyclopentylether and the effects upon covalent binding to mouse skin DNA. *Carcinogenesis*, 10, 321-327.
- Bergenholtz G (1990) Pathogenic mechanisms in pulp disease. *J Endodon*, 16, 98-101.
- Bergenholtz G, Cox CF, Loesche WJ, Syed SA (1982) Bacterial leakage around dental restorations: its effect on the dental pulp. *J Oral Pathol*, 11, 439-450.
- Bergenholtz G, Lindhe J (1975) Effect of soluble plaque factors on inflammatory reactions in the dental pulp. *J Dent Res*, 83, 153-158.
- Bergenholtz G, Warfvinge J (1982) Migration of leukocytes in the dental pulp in response to plaque bacteria. *Scand J Dent Res*, 90, 354-362.
- Bergvall O, Brännström M (1971) Measurements of the space between composite resin fillings and cavity walls. *Swed Dent J*, 64, 217-226.
- Bitman J Cecil HC (1970) Estrogenic activity of DDT analogs and polychlorinated biphenyls. *J Agric Food Chem*, 18, 1108-1112.
- Bloch WW, Austin JC, Cleaton-Jones PE, Wilton-Cox H, Fatti L (1977) Pulpal response to a new visible light-cured composite restorative material: Fotofil. *J Oral Pathol*, 6, 278-287.
- Borzelleca JF, Larson PS, Hennigar GR jr, Huf EG, Crawford EM, Smith RB Jr (1964) Studies on the chronic oral toxicity of monomeric ethyl acrylates and methyl methacrylate. *Toxicol Appl Pharmacol*, 6, 29-36.
- Bouillaguet S, Wataha JC, Hanks CT, Ciucchi B, Holz J (1996) In vitro cytotoxicity and dentin permeability of HEMA. *J Endodon*, 22, 244-248.
- Bowen RL (1956) Use of epoxy resins in restorative materials. *J Dent Res*, 35, 360-369.
- Bowen RL (1958) Synthesis of a silica-resin direct filling material. *J Dent Res*, 37, 90 (M13).

- Bowen RL (1979) Compatibility of various materials with oral tissues. I: The components in composite restorations. J Dent Res, 58, 1493-1503.
- Bowen RL, Bennett PS, Groh RJ, Farahani M, Eichmiller FC (1996) New surface-active comonomer for adhesive bonding. J Dent Res, 75, 606-610.
- Bowen RL, Marjenhoff WA (1992) Dental composites/glass ionomers: The materials. Adv Dent Res, 6, 44-49.
- Bradford EW (1948) Case of allergy to methacrylate. Br Dent J, 84, 195.
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72, 248-254.
- Bradley MO, Bhuyan B, Francis MC, Langenbach R, Peterson A, Huberman E (1981) Mutagenesis by chemical agents in V79 Chinese hamster cells: A review and analysis of the literature. Mutation Res, 87, 81-142
- Branda RF, Blickensderfer DB (1993) Folate deficiency increases genetic damage caused by alkylating agents and γ -irradiation in Chinese hamster ovary cells. Cancer Res, 53, 5401-5408.
- Brännström M (1984) Communication between the oral cavity and the dental pulp associated with restorative treatment. Oper Dent, 9, 57-68.
- Brännström M, Nyborg H (1971) The presence of bacteria in cavities filled with silicate cement and composite resin materials. Swed Dent J, 64, 149-155.
- Brännström M, Vojinovic O (1976) Response of the dental pulp to invasion of bacteria around three filling materials. J Dent Child, 43, 15-21.
- Brauer GM, Dulik DM, Hughes HN, Derman K, Rupp NW (1981) Marginal adaption of Bis-GMA-based composites containing various diluents. J Dent Res, 60, 1966-1971.
- Bridges B (1974) The three-tier approach to mutagenicity screening and the concept of radiation equivalent dose. Mutation Res, 26, 335-340.

- Bridges B (1976) Evaluation of mutagenicity and carcinogenicity using a three-tier system. *Mutation Res*, 41, 71-72.
- Bridges BA (1973) Some general principles of mutagenicity screening and a possible framework for testing procedures. *Environ Health Perspect*, 6, 221-227.
- Bridges BA (1984) Use of the terms mutagenicity and genotoxicity. *Mutation Res.*, 132, 141-142.
- Brotons JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M, Pedraza V, Olea N (1995) Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ Health Perspect*, 103, 608-612.
- Browne RM (1985) In vitro cytotoxicity testing of dental restorative materials. *CRC Critical Reviews in Biocompatibility*, 1, 85-110.
- Browne RM, Tobias RD (1986) Microbial microleakage and pulpal inflammation: a review. *Endod Dent Traumatol*, 2, 177-183.
- Bruce GR, McDonald NJ, Sydiskis RJ (1993) Cytotoxicity of retrofill materials. *J Endodon*, 19, 288-292.
- Brune D, Beltesbrekke H (1981) Levels of methylmethacrylate, formaldehyde and asbestos in dental workroom air. *Scand J Dent Res*, 89, 113-116.
- Brusick D, Auletta A (1985) Developmental status of bioassays in genetic toxicology. *Mutation Res*, 153, 1-10.
- Brusick DJ (1987) Principles of genetic toxicology. Plenum, New York.
- Cameron TP, Rogers-Back AM, Lawlor TE, Harbell JW, Seifried HE, Dunkel VC (1991) Genotoxicity of multifunctional acrylates in the Salmonella/mammalian-microsome assay and mouse lymphoma TK+/- assay. *Environ Mol Mutagen*, 17, 264-271.
- Canter DA, Zeiger E, Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K, Speck W (1986) Comparative mutagenicity of aliphatic epoxides in Salmonella. *Mutation Res*, 172, 105-138.
- Caughman GB, Schuster GS, Lefebvre CA, Knoernschild KL (1996) Effects of HEMA and DMAEMA on epithelial cell neutral lipids. *J Dent Res*, 75, 255 (1897).

- Caughman WF, Caughman GB, Shiflett RA, Rueggeberg F, Schuster GS (1991) Correlation of cytotoxicity, filler loading and curing time of dental composites. *Biomaterials*, 12, 737-740.
- CEN Comite Europeen de Normalisation (1997) EN ISO 7405: Zahnheilkunde - Präklinische Beurteilung der Biokompatibilität von in der Zahnheilkunde verwendeten Medizinprodukten - Prüfverfahren für zahnärztliche Werkstoffe. Rue de Stassart 36, B-1050 Brüssel.
- Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT (1988) Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res*, 16, 11141-11156.
- Chan KC, Soni NN, Khawassah MA (1972) Tissue reactions to two composite resins. *J Prosthet Dent*, 27, 176-180.
- Chan PC, Eustis SL, Huff JE, Haseman JK, Ragan H (1988) Two year inhalation carcinogenesis studies of methyl methacrylate in rats and mice: Inflammation and degeneration of nasal epithelium. *Toxicol*, 52, 237-252.
- Chan PKL, Meek ME, Dormer W (1994) Methyl methacrylate: evaluation of risks to health from environmental exposure in Canada. *Environ Carcinogen Ecotox Rev*, C12, 397-407.
- Chapman VM, Shows TB (1976) Somatic cell genetic evidence for X-chromosome linkage of three enzymes in the mouse. *Nature*, 259, 665-667.
- Chou LS, Chao SM, Bian SS, Cherng SH, Chou MY, Lee H (1996) Suppressive effects of methyl methacrylate on the mutagenicity and DNA adduct formation induced by 1-nitropyrene and benzo[a]pyrene. *Mutagenesis*, 11, 177-181.
- Chu EHY, Malling HV (1968) Mammalian cell genetics. II. Chemical induction of specific locus mutations in Chinese hamster cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 61, 1306-1312.
- Chung K, Greener EH, (1988) Degree of conversion of seven lightcured posterior composites. *J Oral Rehabil*, 15, 555-560.

- Cizeau J, Decoville M, Leng M, Locker D (1996) Large deletions induced in the white gene of *Drosophila melanogaster* by the antitumoral drug cis-dichlorodiammineplatinum(II): influence of non-homologous recombination. *Mutation Res*, 356, 197-202.
- Clayson DB, Arnold DL (1991) The classification of carcinogens identified in the rodent bioassay as potential risks to humans: What type of substance should be tested next. *Mutation Res*, 257, 91-106.
- Climie IJG, Kutson DH, Stoydin G (1981) Metabolism of the epoxy resin component 2,2-bis[4-(2,3-epoxypropoxy)phenyl]propane, the diglycidyl ether of bisphenol A (DGEBA) in the mouse. Part II. Identification of metabolites in urine and feces following a single oral dose of ^{14}C -DGEBA. *Xenobiotica*, 11, 401-424.
- Cochrane JE, Skopek TR (1994) Mutagenicity of butadiene and its epoxide metabolites: II. Mutational spectra of butadiene, 1,2-epoxybutene and diepoxybutane at the hprt locus in splenic T cells from exposed B6C3F1 mice. *Carcinogenesis*, 15, 719-723.
- Collins AR (1993) Mutant rodent cell lines sensitive to ultraviolet light, ionizing radiation, and cross-linking agents: a comprehensive survey of genetic and biochemical characteristics. *Mutation Res*, 239, 99-118.
- Cox CF, Keall CL, Keall HJ, Ostro E, Bergenholtz (1987) Biocompatibility of surface-sealed dental materials against exposed pulps. *J Prosthet Dent*, 57, 1-8.
- Cross NG, Taylor RF, Nunez LJ (1983) "Single-step" orthodontic bonding systems: Possible mutagenic potential. *Am J Orthod*, 84, 344-350.
- Dalleske RL, Stanley HR, Heyde JB (1978) Human pulp response to a new composite system. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 46, 418-424.
- Das L, Das SK, Chu EHY, Sinsheimer JE (1993) Chromosomal aberrations in mouse lymphocytes exposed in vivo and in vitro to aliphatic epoxides. *Mutation Res*, 299, 19-24.

- Davies MJ, Phillips BJ, Rumsby PC (1993) Molecular analysis of mutations at the tk locus of L5178Y mouse-lymphoma cells induced by ethyl methanesulphonate and mitomycin C. *Mutation Res*, 290, 145-153
- De Flora S (1981) Study of 106 organic and inorganic compounds in the Salmonella/microsome test. *Carcinogenesis*, 2, 283-298.
- de Gee AJ, Pallav P (1996) Influence of enzymes and plaque acids on in vitro wear of dental composites. *Biomaterials*, 17, 1327-1332.
- Dearfield KL, Millis CS, Harrington-Brock K, Doerr CL, Moore MM (1989) Analysis of genotoxicity of nine acrylate/methacrylate compounds in L5178Y mouse lymphoma cells. *Mutagenesis*, 4, 381-393.
- Deichmann W (1941) Toxicity of methyl, ethyl, and N-butyl methacrylate. *J Ind Hyg Toxicol*, 23, 343-351.
- DeMarini DM, Brockman HE, de Serres FJ, Evans HH, Stankowski Jr LF, Hsie AW (1989) Specific-locus mutations induced in eukaryotes (especially mammalian cells) by radiation and chemicals: a perspective. *Mutation Res*, 220, 11-29.
- Dermann K, Rentsch H, Rothhaut J (1995) Werkstoffe für die Zahnheilkunde. *Nachr Chem Tech Lab*, 43, 535-544.
- DeSerres FJ, Shelby MD (1979) The Salmonella mutagenicity assay: recommendations. *Science*, 203, 563-565.
- DFG Deutsche Forschungsgemeinschaft (1997) MAK- und BAT-Werte-Liste 1997. Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe. Mitteilung 33. Wiley-VCH, VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-69451 Weinheim.
- Dijken JWV van, Meurman JH, Järvinen J (1980) Effect of finishing procedures on surface textures of some resin restorations. A comparison between new and old types of composite resins. *Acta Odontol Scand*, 38, 293-301.

- Dijken JWV van, Sjöström S (1992) Gingival reactions around and plaque formation on resin composites and glass-ionomer cements. *Adv Dent Res*, 9, 363-366.
- Dijken JWV van, Sjöström S, Wing K (1987a) The effect of different types of composite resin fillings on marginal gingiva. *J Clin Periodontol*, 14, 185-189.
- Dijken JWV van, Sjöström S, Wing K (1987b) Development of gingivitis around different types of resin composites. *J Clin Periodontol*, 14, 257-260.
- Dijken JWV van, Stadigh J, Meurman JH (1983) Appearance of finished and unfinished composite surfaces after toothbrushing. A scanning electronmicroscopy study. *Acta Odontol Scand*, 47, 377-383.
- DIN Deutsches Institut für Normung (1994) EN 30993-3: Biologische Beurteilung von Medizinprodukten. Teil 3: Prüfung auf Gentoxizität, Karzinogenität und Reproduktionstoxizität. Beuth Verlag, Berlin.
- Doerr CL, Harrington-Brock K, Moore MM (1989) Micronucleus, chromosome aberration, and small-colony TK mutant analysis to quantitate chromosomal damage in L5178Y mouse lymphoma cells. *Mutation Res*, 222, 191-203.
- Dummer PMH, Harrison KA (1982) In vitro plaque formation on commonly used dental materials. *J Oral Rehabil*, 9, 413-417.
- Eckardt-Schupp F, Ahne F (1993) Molekulare Methoden der Mutationsanalyse in Säugetierzellen, in: R. Fahrig (Hrsg.), *Mutationsforschung und genetische Toxikologie*. Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt, 50-64.
- Ehling UH (1991) Genetic risk assessment. *Ann Rev Gent*, 25, 255-280.
- Ehrenberg E, Hussain S (1981) Genetic toxicity of some important epoxides. *Mutation Res*, 86, 1-113.
- Eriksen HM, Leidal TI (1979) Monkey pulp response to composite resin restorations in cavities treated with various cleansing agents. *Scand J Dent Res*, 87, 309-317.

- Estlander T, Rajaniemi, Jolanki R (1984) Hand dermatitis in dental technicians. *Contact Derm*, 10, 201-205.
- Fahrig R (1993) *Mutationsforschung und genetische Toxikologie*. Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt.
- Fahrig R, Lang R, Madle S (1991) General strategy for the assessment of genotoxicity. *Mutation Res*, 252, 161-163.
- Fang DN, Hanks CT, Sun ZU, Wataha JC (1996) Immortalized cell culture from transgenic fetal mouse molar dental papillae. *J Dent Res*, 75, 250 (1858).
- Farrell SA, Worton RG (1977) Chromosome loss is responsible for segregation at the *HPRT* locus in Chinese hamster cell hybrids. *Somatic Cell Genet*, 3, 539-551.
- Feldman D, Krishnan A (1995) Estrogens in unexpected places: possible implications for researchers and consumers. *Environ Health Perspect*, 103, 129-133.
- Fenwick RG (1980) Reversion of a mutation affecting the molecular weight of HPGRT: intragenic suppression and localization of X-linked genes. *Somatic Cell Genet*, 6, 477-494.
- Ferracane JL (1994) Elution of leachable components from composites. *J Oral Rehabil*, 21, 441-452.
- Ferracane JL, Condon JR (1990) Rate of elution of leachable components from composite. *Dent Mater*, 6, 282-287.
- Ferracane JL, Greener EH (1984) Fourier transform infrared analysis of degree of polymerization in unfilled resins - methods comparison. *J Dent Res*, 63, 1093-1095.
- Finch CE, Felicio LS, Mobbs CV, Nelson JF (1984) Ovarian and steroidal influences on neuroendocrine aging processes in female rodents. *Endocr Rev*, 5, 467-497.
- Fitzgerald M, Hanks CT (1997) In vivo study of resin diffusion through intact vital human dentin. *J Dent Res*, 76, 305 (2332).
- Flamm WG (1974) A tier system approach to mutagen testing. *Mutation Res*, 26, 329-337.

- Flick DA, Gifford GE (1984) Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J Immunol Methods*, 68, 167-175.
- Ford DK, Yerganian (1958) Observations on the chromosomes of Chinese hamster cells in tissue culture. *J Natl Cancer Inst*, 21, 393-425.
- Fox KR, Higson SL, Scott JE (1992) Methyl green and its analogues bind selectively to AT-rich regions of native DNA. *Eur J Histochem*, 36, 263-270.
- Fox M, Hodgkiss RJ (1981) Mechanisms of cytotoxic action of azaguanine and thioguanine in wild-type V79 cell lines and their relative efficiency in selection of structural gene mutants. *Mutation Res*, 80, 165-185.
- Fredericks HE (1981) Mutagenic potential of orthodontic bonding materials. *Am J Orthod*, 80, 316-324.
- Freund M, Munksgaard EC (1990) Enzymatic degradation of BISGMA/TEGDMA-polymers causing decreased microhardness and greater wear in vitro. *Scand J Dent Res*, 98, 351-355.
- Fuks AB, Funnell B, Cleaton-Jones P (1990) Pulp response to a composite resin inserted in deep cavities with and without surface seal. *J Prosthet Dent*, 63, 129-143.
- Fusco JC, Zimmerman LJ, Fekete A, Setzer RW, Rossiter BJB (1992) Analysis of X-ray-induced HPRT mutations in CHO cells: insertion and deletions. *Mutation Res*, 269, 171-183.
- Gans W (1986) Zytotoxizitätsbestimmungen von sieben Kompositmonomeren. Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.
- Gatehouse D, Haworth S, Cebula T, Gocke E, Kier L, Matsushima T, Melcion C, Nohmi T, Ohta T, Venitt S, Zeiger E (1994) Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. *Mutation Res*, 312, 217-233.
- Gerzina TM, Hume WR (1994) Effect of dentine on release of TEGDMA from resin composite in vitro. *J Oral Rehabil*, 21, 463-468.

- Gerzina TM, Hume WR (1995) Effect of hydrostatic pressure on the diffusion of monomers through dentin in vitro. *J Dent Res*, 74, 369-373.
- Gerzina TM, Hume WR (1996) Diffusion of monomers from bonding resin - resin composite combinations through dentin in vitro. *J Dent*, 24, 125-128.
- Gerzina TM, Picker K, Hood A, Hume WR (1991) Toxicity and quantitative analysis of TEGDMA and composite resin eluates. *J Dent Res*, 70, 424 (1263).
- Gerzina TM, Picker K, Hood A, Hume WR (1991) Toxicity and quantitative analysis of TEGDMA and composite resin eluates. *J Dent Res*, 70, 424-.
- Geurtsen W (1987) Untersuchungen zur zellulären Verträglichkeit von Kompositen für den Seitenzahnbereich. *Dtsch Zahnärztl Z*, 42, 960-963.
- Geurtsen W (1988) Zelluläre Verträglichkeit zahnärztlicher Komposite. Carl Hanser Verlag, München.
- Gibbs RA, Camakrist J, Hodgson GS, Martin RF (1987) Molecular characterization of ¹²⁵I decay and X-ray-induced HPRT mutants in CHO cells. *Int J Radiat Biol*, 51, 193-199.
- Gibbs RA, Nguyen PN, Edwards A, Civitello AB, Caskey CT (1990). Multiplex DNA deletion detection and exon sequencing of the hypoxanthine phosphoribosyl-transferase gene in Lesch-Nyhan families. *Genomics*, 7, 235-244.
- Gilles RJ, Didier N, Denton M (1986) Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem*, 159, 109-113.
- Gilles RJ, Didier N, Denton M (1986) Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem*, 159, 109-113.
- Giver CR, Nelson SL Jr, Cha MY, Pongsaensook P, Grosovsky AJ (1995) Mutational spectrum of X-ray induced TK-human cell mutants. *Carcinogenesis*, 16, 267-275.
- Glatt H (1993) HPRT-Genmutationstest in V79-Zellen des Chinesischen Hamsters. In: Fahrig, R (Hrsg.) Mutationsforschung und genetische Toxikologie. Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt, pp 243-262.

- Glatt H (1994) Comparison of common gene mutation tests in mammalian cells in culture: a position paper of the GUM commission for the development of guidelines for genotoxicity testing. *Mutation Res*, 313, 7-20.
- Glatt H, Gemperlein I, Turchi G, Heinritz H, Doehmer J, Oesch F (1987) Search for cell culture systems with diverse xenobiotic-metabolizing activities and their use in toxicological studies. *Mol Toxicol*, 1, 313-334.
- Glenn JF (1982) Composition and properties of unfilled and composite resin restorative materials. In: Smith DC, Williams DF (Hrsg.): *Biocompatibility of dental materials*. Vol. III. CRC Press, Boca Raton
- Göggelmann W (1993) Die Erfassung von Genmutationen in Bakterien. In: Fahrig, R (Hrsg.) *Mutationsforschung und genetische Toxikologie*. Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt, pp 243-262.
- Goldman M (1983) Polymerization shrinkage of resin-based restorative materials. *Aust Dent J*, 28, 156-161.
- Goldstein JA, Faletto MB (1993) Advances in mechanisms of activation and deactivation of environmental chemicals. *Environ Health Perspect*, 100, 169-176.
- Gonzales F (1989) The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol Rev*, 40, 243-288.
- Gray LE Hr, Monosson E, Kelce WR (1996) Emerging issues: the effects of endocrine disrupters on reproductive development. In: DiGiulio RT, Monosson F (Hrsg.) *Interconnections between human and ecosystems*. Chapman and Hall, London, pp 45-82.
- Greim H, Ahlers J, Bias R, Broecker B, Hollander H, Gelbke H-P, Jakobi S, Klimisch H-J, Mangelsdorf I, Mayr W, Schön N, Stropp G, Stahnecker P, Vogel R, Weber C, Ziegler-Skylakakis K, Bayer E (1995) Assessment of structurally related chemicals: toxicity and ecotoxicity of acrylic acid and acrylic acid alkyl esters (acrylates), methacrylic acid and methacrylic acid alkyl esters (methacrylates). *Chemosphere*, 31, 2637-2659.

- Guengerich FP (1991) Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. *J Biol Chem*, 266, 10019-10020.
- Guillette LJ Jr (1995) Endocrine disrupting environmental contaminants and developmental abnormalities in embryos. *Human Ecol Risk Assess* 1, 25-36.
- Hamid A, Hume WR (1997) The effect of dentine thickness on diffusion of resin monomers in vitro. *J Oral Rehabil*, 24, 20-25.
- Hanks CT, Anderson M, Craig RG (1981) Cytotoxic effects of dental cements on two cell culture systems. *J Oral Pathol*, 10, 101-112.
- Hanks CT, Craig RG, Diehl ML, Pashley DH (1988) Cytotoxicity of dental composites and other materials in a new in vitro device. *J Oral Pathol*, 17, 396-403.
- Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG (1991) Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res*, 70, 1450-1455.
- Hanks CT, Sun Z, Fang D, Wataha JC (1997) Response differences among various passages of MDPC-23 cells to bis-GMA. *J Dent Res*, 76, 156 (1142).
- Hanks CT, Sun Z, Ritchie HH, Wataha JC, Butler WT (1996) Effects of resin components on osteoblast gene expression in vitro. *J Dent Res*, 75, 250 (1862).
- Hanks CT, Wataha JC, Parsell RR, Strawn SE, Fat JC (1994) Permeability of biological and synthetic molecules through dentine. *J Oral Rehabil*, 21, 475-487.
- Hansasuta C, Neiders ME, Aguirre A, Cohen RE (1993) Cellular inflammatory response to direct restorative composite resins. *J Prosthet Dent*, 69, 611-616.
- Hardin BD, Bond GP, Sikov MR, Andrew FD, Beliles RP, Niemeier RW (1981) Testing of selected workplace chemicals for teratogenic potential. *Scand J Work Environ Hlth*, 7, 66-75.
- Harris CC (1991) Chemical and physical carcinogenesis: Advances and perspectives for the 1990. *Cancer Res*, 51, 5023-5044.

- Harsanyi BB, Angleopoulos AP, Gourley JM (1974) Subcutaneous tissue response to composite resins in dogs. *Oral Surg*, 37, 308-319.
- Hartmann PE, Ames BN, Roth JR, Barnes WM, Levin DE (1986) Target sequences for mutagenesis in *Salmonella* histidine-requiring mutants. *Environ Mutagen*, 8, 631-641.
- Heil J, Reifferscheid G, Waldmann P, Leyhausen G, Geurtsen W (1996) Genotoxicity of dental materials. *Mutation Res*, 368, 181-194
- Helbig R (1995) Molekulargenetische und zytogenetische Untersuchungen zur Mutagenese in V79 Hamsterzelllinien mit genomischer Instabilität und defekter DNA-Reparatur. Dissertation. Universität Ulm.
- Helbig R, Gerland E, Speit G (1994) The molecular nature of mutations induced by adriamycin at the *hprt* locus of V79 cells. *Mutagenesis*, 9, 113-116.
- Helbig R, Gerland E, Zdzienicka MZ, Speit G (1995) The pattern of mutations induced by neocarzinostatin and methyl methanesulfonate in the ataxia telangiectasia-like Chinese hamster cell line V-E5. *Mutation Res*, 336, 307-316.
- Helgeland K, Leirskar J (1972) A further testing of the effect of dental materials on growth and adhesion of animal cells in vitro. *Scand J Dent Res*, 80, 206-212.
- Helia O, Paulikova I, Svajdlenka E, Devinsky F, Lacko I, Olaszova E (1995) The hydrolytic activity of microsomal esterases: organ-dependence and species variability. *Pharmazie*, 50, 705-706.
- Hemminki K, Falck K (1979) Correlation of mutagenicity and 4-(*p*-nitrobenzyl) pyridine alkylation by epoxides. *Toxicol Lett*, 4, 103-106.
- Hemminki K, Falck K, Vainio H (1980) Comparison of alkylating rates and mutagenicity of directly acting industrial and laboratory chemicals. *Arch Toxicol*, 46, 277-285.
- Henderson BE, Ross R, Bernstein L (1988) Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Res*, 48, 246-253.

- Hensten-Pettersen A (1984) Allergiske reaktioner på dentale materialer. Den norske tannlegeforenings tidende, 94, 573-578.
- Hensten-Pettersen A (1988) Comparison of the method available for assessing cytotoxicity. Int Endod J, 21, 89-99.
- Hensten-Pettersen A, Helgeland K (1977) Evaluation of biological effects of dental materials using four different cell culture techniques. Scand J Dent Res, 85, 291-296.
- Hensten-Pettersen A, Helgeland K (1981) Sensitivity of different human cell lines in the biological evaluation of dental resin-based restorative materials. Scand J Dent Res, 89, 102-107.
- Hensten-Pettersen A, Jacobsen N (1991) Perceived side effects of biomaterials in prosthetic dentistry. J Prosthet Dent, 65, 138-144.
- Henthorn PS, Smithies O, Mager DL (1990) Molecular analysis of deletions in the human β -globin cluster: Deletion junctions and locations of breakpoints. Genomics, 6, 226-237.
- Hernandez ML, Martinez MJ, Ochoa B (1996) Role of adenine nucleotides in the activation of microsomal cholesterol ester hydrolase by fructose or adenosine in rat hepatocytes. Biochimie, 78, 26-32.
- Heys RJ, Heys DR, Cox CF, Avery JK (1977) Histopathologic evaluation of three ultraviolet-activated composite resins on monkey pulps. J Oral Pathol, 6, 317-330.
- Heys RJ, Heys DR, Fitzgerald M (1985) Histological evaluation of microfilled and conventional composite resins on monkey pulps. Int Dent J, 18, 260-266.
- Hikage S, Sakaguchi K, Sato A, Suzuki S, Cox CF (1996) Cytotoxicity of dental resin monomers with S9-Mix enzymes. J Dent Res, 75, 381 (2908).
- Hoflack JC, Lambolez L, Elias Z, Vasseur P (1995) Mutagenicity of ethylene glycol ethers and their metabolites in *Salmonella typhimurium* his⁻. Mutation Res, 341, 281-287.
- Hörsted PB, Simonsen AM, Larsen MJ (1986) Monkey pulp reaction to restorative materials. Scand J Dent Res, 94, 154-163.

- Hörsted-Bindslev P (1987) Monkey pulp reactions to cavities treated with Gluma Dentin Bond and restored with microfilled composite. *Scand J Dent Res*, 95, 347-355.
- Hume WR (1985) A new technique for screening chemical toxicity to the pulp from dental restorative materials and procedures. *J Dent Res*, 64, 1322-1325.
- Hume WR, Gerzina TM (1996) Bioavailability of components of resin-based materials which are applied to teeth. *Crit Rev Oral BiolMed*, 7, 172-179.
- Hume WR, Gerzina TM, Rouse SR (1993) TEGDMA concentration and cytotoxicity in aqueous eluates of resin composite. *J Dent Res*, 71, 162 (467).
- IARC - International Agency for Research on Cancer (1979) Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Vol. 19, Lyon, France, pp 187-211.
- ICPEMC - International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens: Committee 4 (1983) Final report: Estimation of genetic risks and increased incidence of genetic disease due to environmental mutagens. *Mutation Res*, 115, 255-291.
- Imai Y, Watanabe A, Chang P-I, Masuhara E (1982) Evaluation of the biologic effects of dental materials using a new cell culture technique. *J Dent Res*, 61, 1024-1027.
- Inokoshi S, Iwaku M, Fusayama (1982) Pulpal response to a new adhesive restorative resin. *J Dent Res*, 61, 1014-1019.
- Inoue K, Hayashi I (1982) Residual monomer (Bis-GMA) of composite resin. *J Oral Rehabil*, 9, 493-497.
- ISO International Organization for Standardization (1992a) ISO 10993-1: Biological evaluation of medical devices - part 1: Guidance on selection of tests. Case Postale 56, CH-1211 Geneve 20.
- ISO International Organization for Standardization (1992b) ISO 10993-3: Biological evaluation of medical devices - part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity. Case Postale 56, CH-1211 Geneve 20.

- ISO International Organization for Standardization (1997) ISO 7405: Dentistry - Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry - Test methods for dental materials. Case Postale, CH-1211 Geneve 20.
- Ivett JL, Brown BM, Rodger C, Anderson BE, Resnick MA, Zeiger E (1989) Environ Mol Mutagen, 14, 165-187.
- Jakobs L, Bean CL, Marx JA (1983) Optimal phenotypic expression times for HPRT mutants induced in foreskin-, skin-, and lung-derived human diploid fibroblasts. Environ Mutagen, 5, 717-731.
- Janatipour M, Trainor KJ, Kutlaca R, Bennetti G, Hay J, Turner DR, Morley AA (1988) Mutations in human lymphocytes studied by an HLA selection system. Mutation Res, 198, 221-226.
- Jontell M, Hanks CT, Bratel J, Bergenholtz (1995) Effects of unpolymerized resin components on the function of accessory cells derived from rat incisor pulp. J Dent Res, 74, 1162-1167.
- Kallus T (1984) Enhanced tissue response to denture base polymers in formaldehyde-sensitized guinea pigs. J Prosthet Dent, 52, 292-299.
- Kallus T, Mjör IA (1991) Incidence of adverse effects of dental materials. Scand J Dent Res, 99, 236-240.
- Kanerva L, Estlander T, Jolanki R (1989) Allergic contact dermatitis from dental composite resins due to aromatic epoxy acrylates and aliphatic acrylates. Contact Derm, 20, 201-211.
- Kanerva L, Estlander T, Jolanki R, Tarvainen K (1993) Occupational allergic contact dermatitis caused by exposure to acrylates during work with dental prostheses. Contact Derm, 28, 268-275.
- Kanerva L, Jolanki R, Estlander T (1986) Occupational dermatitis due to an epoxy acrylate. Contact Derm, 14, 80-84.

- Kanerva L, Tarvainen K, Pinola A, Lein T, Granlund H, Estlander T, Joöanki R, Förström L (1994) A single accidental exposure may result in a chemical burn, primary sensitization and allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis*, 31, 229-235.
- Kao FT, Puck TT (1968) Genetics of somatic mammalian cells. VII. Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75, 415-419.
- Kier LE, Brusick DJ, Auletta AE, von Halle ES, *et al.* (1986) The Salmonella typhimurium/mammalian microsomal assay. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res*, 168, 69-240.
- Klassen CD (1986) Principles of toxicology. In: Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poison. Macmillan Publishing Comp., 3rd edition, New York, pp 11-32.
- Köberle B, Haupter S, Just W, Speit G (1991) Mutation screening of bleomycin-induced mutants using multiplex polymerase chain reaction. *Mutagenesis*, 6, 527-531.
- Köberle B, Röscheisen C, Helbig R, Speit G (1993) Molecular characterization of methyl methansulfonate (MMS)-induced HPRT mutations in V79 cells. *Mutation Res*, 301, 65-71.
- Köberle B, Speit G (1991) Molecular characterization of mutations at the hprt locus in V79 Chinese hamster cells induced by bleomycin in the presence of inhibitors of DNA repair. *Mutation Res*, 249, 161-167.
- Koda T, Tsuchiya H, Yamauchi M, Ohtani S, Takagi N, Kawano J (1990) Leachability of denture-base acrylic resins in artificial saliva. *Dent Mater*, 6, 13-16.
- Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecen T, *et al.* (1989) The molecular basis for Duchenne muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet*, 45, 498-506.
- Krahn DF, Heidelberger C (1977) Liver-homogenate mediated mutagenesis in Chinese hamster V79 cells by polycyclic aromatic hydrocarbons and aflatoxins. *Mutation Res*, 46, 27-44.

- Krawczak M, Cooper DN (1991) Gene deletions causing human genetic disease: mechanisms of mutagenesis and the role of the local DNA sequence environment. *Hum Genet*, 86, 425-441.
- Krenitzky TA, Papaioannou R, Elion GB (1969) Human hypoxanthine phosphoribosyltransferase. I. Purification, properties and specificity. *J Biol Chem*, 244, 1263-1270.
- Kueng W, Silber E, Eppenberger U (1989) Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal Biochem*, 182, 16-19.
- Kuroki T, Drevon C, Montesano R (1977) Microsome-mediated mutagenesis in V79 Chinese hamster cells by various nitrosamines. *Nature*, 271, 368-370.
- Lambert B, Bastlova T, Osterholm AM, Hou SM (1995) Analysis of mutation at the hprt locus in human T lymphocytes. *Toxicol Lett*, 82-83, 323-333.
- Larsen IB, Freund M, Munksgaard C (1992) Change in surface hardness of BisGMA/TEGDMA polymer due to enzymatic action. *J Dent Res*, 71, 1851-1853.
- Lefebvre CA, Knoernschild KL, Schuster GS (1994) Cytotoxicity of eluates from light polymerized denture base resins. *J Prosthet Dent*, 72, 644-650.
- Lefebvre CA, Schuster GS (1994) Biocompatibility of visible light-cured resin systems in prosthodontics. *J Prosthet Dent*, 71, 178-185.
- Lefebvre CA, Schuster GS, Rueggeberg FA, Tamareselvy K, Knoernschild KL (1996) Responses of oral epithelial cells to dental resin components. *J Biomater Sci Polymer Edn*, 7, 965-976.
- Lehmann F, Leyhausen G, Geurtsen W (1996) Usefulness of primary gingival fibroblast cultures for cytotoxicity tests. *J Dent Res*, 75, 254 (1896).
- Leidal TI, Eriksen HM (1985) Human pulp response to composite resin restorations. *Endod Dent Traumatol*, 1, 66-68.
- Lerda D, Rizzi R (1992) Cytogenic study of persons occupationally exposed to ethylene oxide. *Mutation Res*, 282, 31-37.

- Levin DE, Hollstein M, Christman MF, Schwiers EA, Ames BN (1982b) A new Salmonella tester strain, TA102, with AT base pairs at the site of the mutation detects oxidative mutagens. Proc Natl Acad Sci USA, 79, 7445-7449.
- Levin DE, Yamasaki E, Ames BN (1982a) A new Salmonella tester strain, TA97, for the detection of frameshift mutagens. Mutation Res, 94, 315-330.
- Lewis JB, Schwartz H, Lefebvre CA, Knoerschild KL, Schuster GS (1996) Cellular RNA responses to denture base resins. J Dent Res, 75, 356 (2705).
- Leyhausen G, Heil J, Reifferscheid G, Geurtsen W (1995) Das genotoxische Potential von Kompositbestandteilen. Dtsch Zahnärztl Z, 50, 134-136.
- Leyhausen G, Lehmann F, Geurtsen W (1997) Cytocompatibility of 38 composite monomers/additives in human oral primary cell cultures. J Dent Res, 76, 382 (2945).
- Li Y, Noblitt TW, Dunipace AJ, Stookey GK (1990) Evaluation of mutagenicity of restorative dental materials using the Ames/microsome test. J Dent Res, 69, 1188-1192.
- Lichtenauer-Kaligis EG, Thijssen JC, den Dulk H, van de Putte P, Giphart-Gassler M, Tasseron de Jong JG (1995) Spontaneous mutation spectrum in the hprt gene in human lymphoblastoid TK6 cells. Mutagenesis, 10, 137-143.
- Love DR, England SB, Speer A, Marsden RF, Bloomfield JF, Roche AL, Cross GS, Mountford RC, Smith TJ, Davis K (1991) Sequences of junction fragments in the deletion-prone region of the dystrophin gene. Genomics, 10, 57-67.
- Madle S, Lang R (1993) Assessment and evaluation of genotoxicity findings. Mutation Res, 291, 87-91.
- Maguire MC (1988) Experimental photoallergic contact dermatitis to bisphenol A. Acta Derm Venerol, 68, 402-412.
- Manjanatha MG, Newton RK, Mittelstaedt RA, Villani GRD, Declos KB, Heflich RH (1993) Molecular analysis of DNA adducts and hprt mutations produced by 6-nitrosochrysene in Chinese hamster ovary cells. Carcinogenesis, 14, 1863-1870.

- Marez T, Shirali P, Hildebrand HF, Haguenoer JM (1991) Increased frequency of sister chromatid exchange in workers exposed to high doses of methylmethacrylate. *Mutagenesis*, 6, 127-129.
- Mariotti A, Johnson S, Söderholm K-LM (1997) The estrogenic effect of bisGMA on estrogen-sensitive target tissues. *J Dent Res*, 76, 326 (2503).
- Maron DM, Ames BN (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res*, 113, 173-215.
- Marshall CJ (1991) Tumor suppressor genes. *Cell*, 64, 313-326.
- Marx J (1994) New link found between p53 and DNA repair. *Science*, 266, 1321-1322.
- Matsushima T, Sawamura M, Hara K, Sugimara T (1976) A safe substitute for polychlorinated biphenyls as an inducer of metabolic activation in mutagenesis testing. In: de Serres FJ, Fout JR, Bend JR, Philipot RM (Eds.:) *In vitro metabolic activation in mutagenesis testing*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp 85-88.
- McCann J, Choi E, Yamasaki E, Ames BN (1975) Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 72, 5135-5139.
- McCarthy TJ, Hayes EP, Schwartz CS, Witz G (1994) The reactivity of selected acrylate esters toward glutathione and deoxyribonucleosides in vitro: structure-activity relationship. *Fundam Appl Toxicol*, 22, 543-548.
- McGregor DB (1984) Genotoxicity of glycol ethers. *Environ Health Perspect*, 57, 97-103.
- McLachlan JA (1980) *Estrogens in the environment*. Elsevier/North-Holland, New York.
- McLachlan JA (1993) Functional toxicology: a new approach to detect biologically active xenobiotics. *Environ Health Perspect*, 101, 386-387.
- Meryon SD (1988) The model cavity method incorporating dentine. *Int Endod J*, 21, 79-84.
- Meryon SD, Riches DWH (1982) A comparison of the in vitro cytotoxicity of four restorative materials assessed by changes in enzyme levels in two cell types. *J Biomed Mater Res*, 16, 519-528.

- Meryon SD, Uphill PF, Cordery AD, Browne RM (1985) A reproducibility study of the model cavity method for the in vitro toxicity testing of dental restorative materials. *ATLA*, 12, 223-251.
- Miller EG, Thompson LR, Zimmermann ER, Bowles WH (1984) In vivo studies on the carcinogenic potential of an orthodontic bonding resin. *Am J Orthod*, 86, 342-346.
- Mjör IA, Hensten-Pettersen A, Skogedal (1977) Biologic evaluation of filling materials. A comparison of results using cell culture techniques, implantation tests and pulp studies. *Int Dent J*, 27, 124-129.
- Moore DL, Barker BF (1986) A foreign body lesion of the gingiva subsequent to the placement of a composite resin restoration. *Quintessence International*, 17, 785-787.
- Moore MM, Amtower A, Doerr CL, Brock K, Dearfield KL (1988) Genotoxicity of acrylic acid, methyl acrylate, ethyl acrylate, methyl methacrylate, and ethyl methacrylate in L5178Y mouse lymphoma cells. *Environ Mol Mutagenesis*, 11, 49-63.
- Moore MM, Harrington-Brock K, Doerr CL, Dearfield KL (1989) Differential mutant quantitation at the mouse lymphoma *tk* and CHO *hgpRT* loci. *Mutagenesis*, 4, 394-403.
- Morgan LT, Fleck EW, Poston KA, Denovan BA, Newman CN, Rossiter BJF, Miller JH (1990) Molecular characterization of X-ray-induced mutations at the HPRT locus in plateau-phase Chinese hamster ovary cells. *Mutation Res*, 232, 171-182.
- Morrissey RE, George JD, Price CT, Tyl RW, Marr MC, Kimmel CA (1987) The developmental toxicity of bisphenol A in rats and mice. *Fund Appl Toxicol*, 8, 571-582.
- Mullis K, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods of Enzymology*, 155, 335-350.
- Munksgaard EC (1992a) Toxicology versus allergy in restorative dentistry. *Adv Dent Res*, 6, 17-21.
- Munksgaard EC (1992b) Permeability of protective gloves to (di)methacrylate in resinous dental materials. *Scand J Dent Res*, 100, 189-192.
- Munksgaard EC, Freund M (1990) Enzymatic hydrolysis of (di)methacrylates and their polymers. *Scand J Dent Res*, 98, 261-267.

- Munksgaard EC, Hansen EK, Engen T, Holm U (1996) Self-reported occupational dermatological reactions among Danish dentists. *Eur J Oral Sci*, 104, 396-402.
- Munksgaard EC, Knudsen B, Thomsen K (1990) Contact dermatitis due to (d)methacrylates on the hands of dental personnel. *Tandlaegebladet*, 94, 270-274.
- Mürer AJL, Poulsen OM; Roed-Pettersen J, Tüchsen F (1995a) Skin problems among Danish dental technicians. *Contact Dermatitis*, 33, 42-47.
- Mürer AJL, Poulsen OM; Roed-Pettersen J, Tüchsen F (1995b) Rapid increase in skin problems among dental technician trainees working with acrylates. *Contact Dermatitis*, 33, 106-111.
- Myers CL, Stanley HR, Heyde JB, Chamberlain J (1976) Primate pulpal response to ultraviolet light-polymerized direct-bonding materials systems. *J Dent Res*, 55, 1118-1124.
- Myhr BC, Mayo JK (1987) Mutagenicity of rat-liver S9 to L5178Y mouse lymphoma cell. *Mutation Res*, 198, 27-37.
- Nassiri MR, Hanks CT, Cameron MJ, Strawn SE, Craig RG (1994) Application of flow cytometry to determine the cytotoxicity of urethane dimethacrylate in human cells. *J Biomed Mater Res*, 28, 153-158.
- Nathanson D, Lockhart P (1979) Delayed extraoral hypersensitivity to dental composite materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 47, 329-333.
- Nestmann ER, Brillinger RL, Gilman JP, Rudd CJ, Swierenga SH (1991) Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories: II. Mutation in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and L5178Y mouse lymphoma cells. *Mutation Res*, 246, 255-284.
- Newton RK, Mittelstaedt RA, Heflich RH (1992) Analysis of solvent control and 1-nitrosopyrene-induced Chinese hamster ovary cell mutants by Southern and Northern Blots and the polymerase chain reaction. *Environ Mol Mutagen*, 19, 147-155.
- Nicklas JA, Hunter TC, O'Neill JP, Albertini RJ (1989) Molecular analysis of in vivo hprt mutations in human T-lymphocytes. III. Longitudinal study of hprt gene structural alterations and T-cell clonal origins. *Mutation Res*, 215, 147-160.

- Noort R van, Davis LG (1984) The surface finish of composite restorative materials. *Brit Dent J*, 157, 360-364.
- NTP National Toxicology Program (1982) Carcinogenesis bioassay of bisphenol A in F344 rats and B₆C₃F₁ mice. National Toxicology Program Technical Report, 215, 1-116.
- NTP National Toxicology Program (1986) NTP Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of Methyl Methacrylate in F344/N Rats and B6C3F1 Mice. NTP TR 314, NIH Publ. No. 87-2570, US Dept HHS, Public Health Service, NIH.
- Nyhan WL, Pesek J, Sweetman L, Carpenter DG, Carter CH (1967) Genetics of an X-linked disorder of uric acid metabolism and cerebral function. *Pediatr Res*, 1, 5-13.
- Obe G, Johannes C, Schulte-Frohlinde D (1992) DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations, and oncogenic transformation. *Mutagenesis*, 7, 3-12.
- OECD (1993) OECD guidelines for the testing of chemicals. *Genetic Toxicology*, 471-485. Organization for Economic Co-operation and Development, Publications Service, 2 rue Andre-Pascal, 75775 Paris Cedex 16.
- Okamoto Y, Shintani H, Inoue T, Okuda K (1986) Effects of water-extractable components from bis-GMA based methacrylate resin on collagen from bovine tendon. *Arch Oral Biol*, 31, 639-641.
- Olea N, Pulgar R, Perez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrell A, Pedraza V, Soto AM, Sonnenschein C (1996) Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect*, 104, 298-305.
- Oppenheimer BS, Oppenheimer ET, Danishefsky AP, Stout AP, Eirich FR (1955) Further studies of polymers as carcinogenic agents in animals. *Cancer Res*, 15, 333-340.
- Osterholm AM, Falt S, Lambert B, Hou SM (1995) Classification of mutations at the human hprt-locus in T-lymphocytes of bus maintenance workers by multiple-PCR and reverse transcriptase analysis. *Carcinogenesis*, 16, 1909-1912.

- Oysaed H, Ruyter IE (1986) Water sorption and filler characteristics of composites for use in posterior teeth. J Dent Res, 65, 1315-1318.
- Oysaed H, Ruyter IE, Kleven IJS (1988) Release of formaldehyde from dental composites. J Dent Res, 67, 1289-1294.
- Panagakos F (1996) Transformation of human pulp cells with SV40: Preliminary characterization. J Dent Res, 75, 250 (1861).
- Parisis DM, Eskoz NL, Henderson WG (1994) Mutagenicity of ethanol extracts of used acrylic dentures. Mutation Res, 321, 241-251.
- Parker AG, Pinot F, Grant DF, Spearow J, Hammock BD (1996) Regulation of mouse liver microsomal esterases by clofibrate and sexual hormones. Biochem Pharmacol, 8, 677-685.
- Pashley DH (1994) Dentine permeability and its role in the pathobiology of dentine sensitivity. Arch Oral Biol, 39 Suppl: 73S-80S.
- Pastink A, Vreeken C, Nivard MJM, Searles LL, Vogel EW (1989) Sequence analysis of N-ethyl-nitrosourea-induced v mutations in *Drosophila melanogaster*. Genetics, 123, 123-129.
- Pearson GJ, Longman CM (1989) Water sorption and solubility of resin-based materials following inadequate polymerization by a visible-light curing system. J Oral Rehabil, 16, 57-61.
- Peutzfeldt A (1997) Resin composites in dentistry: the monomer systems. Eur J Oral Sci, 105, 97-116.
- Pfeiffer E, Rosenberg B, Deuschel S, Metzler M (1997) Interference with microtubules and induction of micronuclei in vitro by various bisphenols. Mutation Res, 390, 21-31.
- Phillips DL, Bean TA, Tong PY, Eick JD, Yourtee DM (1996) Methacrylate monomer hydrolysis by serum and macrophage cells. J Dent Res, 75, 329 (2493).
- Phillips JW, Morgan WF (1993) DNA double strand breaks in mutagenesis. Environ Mol Mutagenesis, 22, 214-217.

- Ponder BAJ (1988) Gene losses in human tumors. *Nature*, 335, 400-402.
- Poss R, Thilly WG, Kaden DA (1979) Methyl methacrylate is a mutagen for *Salmonella typhimurium*. *J Bone Joint Surg Am*, 61, 1203-1207.
- Przybojewska B, Dziubaltowska E, Kowalski Z (1984) Genotoxic effects of ethyl acrylate and methylacrylate in the mouse evaluated by the micronucleus test. *Mutation Res*, 135, 189-191.
- Qvist V (1975) Pulp reactions in human teeth to tooth colored filling materials. *Scand J Dent Res*, 88, 54-66.
- Rao SR (1971) Pulp response in the rhesus monkey to "composite" dental restorative materials in unlined cavities. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 31, 676-688.
- Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB (1995) Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res*, 74, 1602-1606.
- Rathbun MA, Craig RG, Hanks CT, Filisko FE (1991) Cytotoxicity of a Bis-GMA dental composite before and after leaching in organic solvents. *J Biomed Mater Res*, 25, 443-457.
- Rathinam K, Mohanan PV (1993) Skin sensitization study of a new Bis-GMA based dental restorative Materials. *Biomater Art Cells & Immob Biotech*, 21, 91-96.
- Rinchik EM, Bangham JW, Hunsicker PR, Cacheiro NLA, Kwon BS, Jackson IJ, Russell LB (1990) Genetic and molecular analysis of chlorambucil-induced germ-line mutations in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, 1416-1420.
- Rinkus SJ, Legator MS (1979) Chemical characterization of 465 known or suspected carcinogens and their correlation with mutagenic activity in the *Salmonella typhimurium* system. *Cancer Res*, 39, 3289-3318.
- Röhm (1996a) 2,2-Bis-(4-(3'-methacryloyloxy-2'-hydroxy)propoxyphenyl)propan, Handelsname PLEX 6662-0, Prod.schl. 944, Röhm GmbH Chemische Fabrik, Kirschenallee, 64275 Darmstadt, Sicherheitsdatenblatt.

- Röhm (1996b) 7,7,9-(bzw. 7,9,9-)Trimethyl-4,13-dioxo-3,14-dioxa-5,12-diaza-hexadecan-1,16-diol-dimethacrylat, Handelsname PLEX 6661-0, Prod.schl. 620, Röhm GmbH Chemische Fabrik, Kirschenallee, 64275 Darmstadt, Sicherheitsdatenblatt.
- Rose LA, Tong PY, Eick JD, Chappelow CC, Yourtee DM (1996) A study of the mutagenicity of non-shrinking spiroorthocarbonate co-polymers. *J Dent Res*, 75, 329 (2492).
- Rosenkranz HS (1988) Strategies for the development of batteries of short-term tests. *Mutation Res*, 205, 1-426.
- Rossiter BJB, Caskey CT (1990) Molecular scanning methods of mutation detection. *J Biol Chem*, 265, 12753-12756.
- Rossiter BJB, Fuscoe JC, Muzny DM, Fox M, Caskey CT (1991) The Chinese hamster HPRT gene: restriction map, sequence analysis, and multiplex PCR deletion screen. *Genomics*, 9, 247-256.
- Rossman TG, Klein CB (1988) From DNA damage to mutation in mammalian cells: a review. *Environ Mol Mutagen*, 11, 119-133.
- Roulet JF, Roulet-Mehrens TK (1981) The surface roughness of restorative materials and dental tissue after polishing with prophylaxis and polishing pastes. *J Periodontol*, 53, 257-266.
- Rueggeberg F, Tamareselvy K (1995) Resin cure determination by polymerization shrinkage. *Dent Mater*, 11, 265-268.
- Russell LB, Hunsicker PR, Cacheiro NLA, Bangham JW, Russell WL, Shelby MD (1989) Chlorambucil effectively induced deletion mutations in mouse germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86, 3704-3708.
- Rustemeyer T, Frosch PJ (1996) Occupational skin diseases in dental laboratory technicians. (I). Clinical pictures and causative factors. *Contact dermatitis*, 34, 125-133.
- Ruyter E (1985) Monomer systems and polymerization. In: Posterior composite resin dental restorative materials (Hrsg.: Vanherle G, Smith DC), 109-135. Peter Szule Publishing Co., Niederlande.

- Ruyter IE (1980) Release of formaldehyde from denture base polymers. *Acta Odontol Scand*, 38, 17-27.
- Ruyter IE (1982) Methacrylate-based polymeric dental materials: conversion and related properties. *Acta Odontol Scand*, 40, 359-376.
- Ruyter IE (1995) Physical and chemical aspects related to substances released from polymer materials in an aqueous environment. *Adv Dent Res*, 9, 344-347.
- Ruyter IE, Oysaед H (1982) Conversion in different depth of ultraviolet and visible light activated composite materials. *Acta Odontol Scand*, 40, 179-192.
- Ruyter IE, Oysaед H (1987) Composites for use in posterior teeth: Composition and conversion. *J Biomed Mater Res*, 21, 11-23.
- Ruyter IE, Svendsen (1978) Remaining methacrylate groups in composite restorative materials. *Acta Odontol Scand*, 36, 75-82.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Horn GT, Erlich HA, Aenheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230, 1350-1354.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition. New York.
- Sankaranarayanan K (1993) Ionizing radiation, genetic risk estimation and molecular biology: impact and interferences. *Trends Genet*, 9, 79-84.
- Sax NI (1975) Toxicology of phenols. In Sax NI (Hrsg.) *Dangerous properties of industrial chemicals*. Von Nostrand Reinhold, New York, pp 458-1008.
- Schmalz G (1979) Der Einfluß von Methyl-Methakrylat-Monomer auf den Stoffwechsel von L-Zellen. *Dtsch Zahnärztl Z*, 34, 193-195.
- Schmalz G (1981) Die Gewebeverträglichkeit zahnärztlicher Materialien. Möglichkeiten einer standardisierten Prüfung in der Zellkultur. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Schmalz G (1982) Korrelationsanalysen zwischen Zellkulturen und Tierversuch. *Dtsch Zahnärztl Z*, 37, 184-186.

- Schmalz G (1985) Biologische Eigenschaften von Komposit-Füllungsmaterialien. Dtsch Zahnärztl Z, 40, 897-901.
- Schmalz G (1988) Agar overlay method. Int Endod J, 21, 59-66.
- Schmalz G (1995) Biological evaluation of medical devices: a review of EU-regulations, with emphasis on in vitro screening for biocompatibility. ATLA, 23, 469-473.
- Schmalz G, Bühler HJ (1983) Toxizitätsprüfungen von Füllungsmaterialien im Ratten-Implantationstest. Dtsch Zahnärztl Z, 38, 254-258.
- Schmalz G, Schmalz C (1981) Toxicity tests on dental filling materials. Int Dent J, 31, 185-192.
- Schmalz G, Schweikl H (1990) A semi-automated cell culture evaluation system for cytotoxicity testing of dental materials. J Mater Sci: Materials in Medicine, 1, 228-232.
- Schmalz G, Schweikl H (1994) Characterization of an in vitro dentin barrier test using a standard toxicant. J Endodon, 20, 592-594.
- Schmalz G, Sharaf M (1988) Die Verwendung unterschiedlicher Zellarten im Agar-Diffusions-Test. Z Zahnärztl Implantol, IV, 240-245.
- Schmalz G, Starkmann-Polz R, Schweikl H (1989) Dependence of cytotoxicity of different cements upon storage conditions. J Dent Res, 68, 627 (144).
- Schuchardt (1994a) Methylmethacrylat (MMA), Artikelnummer 800590, Schuchardt & Co; 85662 Hohenbrunn, Sicherheitsdatenblatt.
- Schuchardt (1994b) (2-Hydroxyethyl)-methacrylat (HEMA), Artikelnummer 800588, Schuchardt & Co; 85662 Hohenbrunn, Sicherheitsdatenblatt.
- Schuchardt (1994c) (2,3-Epoxypropyl)-methacrylat, Glycidylmethacrylat (GMA), Artikel-nummer 800609, Schuchardt & Co; 85662 Hohenbrunn, Sicherheitsdatenblatt.
- Schuchardt (1994d) 2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-propan, Artikelnummer 803546, Schuchardt & Co; 85662 Hohenbrunn, Sicherheitsdatenblatt.
- Schuster GS, Caughman GB, Knoernschild KL, Lefebvre CA (1997) Variable cell responses to an aminomethacrylate. J Dent Res, 76, 326 (2501).

- Schuster GS, Erbland JF, Knoerschild K, Rueggeberg F, Lefebvre CA (1996) Effects of aminomethacrylate on cell membrane phospholipids. *J Dent Res*, 75, 255 (1898).
- Schwartz JL, Rotmensch J, Sun J, An J, Xu Y, Hsie AW (1994) Multiplex polymerase chain reaction-based deletion analysis of spontaneous, gamma ray- and alpha-induced hprt mutants of CHO-K1 cells. *Mutagenesis*, 9, 537-540.
- Schweikl H, Schmalz G (1991) Evaluation of the mutagenic potential of root canal sealers using the Salmonella/microsome assay. *J Mat Sci: Materials in Medicine*, 2, 181-185.
- Schweikl H, Schmalz G (1996a) Mutagenicity of glutaraldehyde-containing bonding agents in the V79/hprt assay. *J Dent Res*, 75, 333 (2524).
- Schweikl H, Schmalz G (1996b) Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. *Eur J Oral Sci*, 104, 292-299.
- Schweikl H, Schmalz G (1997) Glutaraldehyde-containing dentin bonding agents are mutagens in mammalian cells *in vitro*. *J Biomed Mater Res*, 36, 284-288.
- Schweikl H, Schmalz G, Bey B (1994) Mutagenicity of Dentin Bonding Agents, *J Biomed Mater Res*, 28, 1061-1067.
- Schweikl H, Schmalz G, Göttke C (1996a) Mutagenic activity of various dentin bonding agents. *Biomaterials*, 17, 1451-1456.
- Schweikl H, Schmalz G, Göttke C, Reitingner T (1996b) The mutagenic activity of various dentin bonding agents. *J Dent Res*, 75, 436 (3347).
- Schweikl H, Schmalz G, Stimmelmayer H, Bey B (1995) The endodontic sealer AH26 in the V79/hprt cell mutation assay. *J Endodon*, 21, 407-410.
- Segal A, Fedyk J, Melchionne S, Seidman I (1987) The isolation and characterization of 2-carboxyethyl adducts following in vitro reaction of acrylic acid with calf thymus DNA and bioassay of acrylic acid in female Hsd:(ICR)Br mice. *Chem-Biol Interactions*, 61, 189-197.
- Shanabruch WG, Walker GC (1980) Localization of the plasmid (pKM101) gene(s) in *recA⁺/lexA⁺*-dependent mutagenesis. *Molec Gen Genet*, 179, 289-297.

- Shintani H (1995) HPLC analysis of toxic additives and residual monomer from dental plate. J Liq Chromatogr, 18, 613-626.
- Sierra LM, Pastink A, Nivard MJM, Vogel EW (1993) DNA base sequence changes induced by diethylsulfate in postmeiotic male germ cells of *Drosophila melanogaster*. Mol Gen Genet, 237, 370-374.
- Sigma (1994) Methyl methacrylate, Katalog-Nr. 64200, Sigma-Aldrich Vertriebs GmbH, Grünwalder Weg, 82041 Deisenhofen, Sicherheitsdatenblatt.
- Sigma (1995) Triethylen glycol dimethacrylate, Katalog-Nr. T5537, Sigma-Aldrich Vertriebs GmbH, Grünwalder Weg, 82041 Deisenhofen, Sicherheitsdatenblatt.
- Simmon V (1979) In vitro mutagenicity of chemical carcinogens and related compounds with Salmonella typhimurium. J Natl Cancer Inst, 62, 893-899.
- Singh AR, Lawrence WH, Autian J (1972) Embryonic-fetal toxicity and teratogenic effects of a group of methacrylate esters in rats. J Dent Res, 51, 1632-1638.
- Singh AR, Lawrence WH, Autian J (1972) Embryonic-fetal toxicity and teratogenic effects of a group of methacrylate esters in rats. J Dent Res, 51, 1632-1638.
- Singh B, Gupta RS (1983) Mutagenic response of thirteen anticancer drugs on mutation induction at multiple genetic loci and on sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. Cancer Res, 43, 577-584.
- Singh V, Sinha S, Mishra S, Chaturvedi LS, Pradhan S, Mittal RD, Mittal B (1997) Proportion and pattern of dystrophin in north Indian Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. Hum Genet, 99, 206-208.
- Sinsheimer JE, Chen R, Das SK, Hooberman BH, Osorio S, You Z (1993) The genotoxicity of enantiomeric aliphatic epoxides. Mutation Res, 298, 197-206.
- Skjorlund KK (1973) Plaque accumulation on different filling materials. Scan J Res Dent, 81, 538-542.
- Skjorlund KK, Sonju T (1982) Effect of sucrose rinses on bacterial colonization on amalgam and composite. Acta Odontol Scand, 40, 193-196.

- Small K, Iber JI, Warren ST (1997) Emerin deletion reveals a common X-chromosome inversion mediated by inverted repeats. *Nature Genet*, 16, 96-99.
- Smith ML, Chen I.-T, Zhan Q, Bae I, Chen C-Y, *et al.*, (1994) Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science*, 266, 1376-1380.
- Sobels FH (1985) A comprehensive exercise in comparative mutagenesis with exciting outcome, or How good are mutation assays in predicting carcinogenesis. *Mutation Res*, 147, 1-4.
- Sobels FH (1989) Models and assumptions underlying genetic risk assessment. *Mutation Res*, 212, 77-89.
- Sobels FH (1990) International symposium on strategies for the control of mutagenic and carcinogenic risk. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 10, 239-245.
- Sobels FH (1993) Approaches to assessing genetic risks from exposure to chemicals. *Environ Health Perspect*, 101 (Suppl 3), 327-332.
- Sohoel H, Gjerdet NR, Hensten-Pettersen A, Ruyter IE (1994) Allergenic potential of two orthodontic bonding materials. *Scand J Dent Res*, 102, 126-129.
- Solomon JJ (1994) DNA adducts of lactones, sulfones, acylating agents and acrylic compounds. *IACR Scientific Publications No.125*, 179-198.
- Spahl W, Budzikiewicz H, Geurtsen W (1991) Eine Untersuchung zum Restmonomergehalt und Additavagehalt verschiedener Hybridkomposite. *Dtsch Zahnärztl Z*, 46, 471-475.
- Spangberg L, Rodrigues H, Langeland L, Langeland K (1973) Biologic effects of dental materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 36, 713-724.
- Spealman Cr, Main RJ, Haag HB, Larson PS (1945) Monomeric methyl methacrylate. *Ind Med*, 14, 292-298.
- Speit G, Menz W, Röscheisen C, Köberle B (1992) Cytogenetic and molecular characterization of the mutagenicity of chlorambucil in V79 cells. *Mutation Res*, 283, 75-81.
- Stanley HR (1992) Local and systemic responses to dental composites and glass ionomers. *Adv Dent Res*, 6, 55-64.

- Stanley HR, Bowen RL, Folio J (1979) Compatibility of various materials with oral tissues II. Pulp responses to composite ingredients. *J Dent Res*, 58, 1507-1517.
- Stanley HR, Going RE, Chauncey HHJ (1975) Human pulp response to acid pretreatment of dentin and to composite restoration. *JADA*, 91, 817-825.
- Stanley HR, Myers CL, Heyde JB, Chamberlain J (1972) Primate pulp response to a ultraviolet light cured restorative materials. *J Oral Pathol*, 1, 108-114.
- Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WKA, *et al.*, (1997) Identification of a candidate tumor suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nature Genet*, 15, 356-362.
- Steiner S, Hönger G, Sagelsdorff P (1992) Molecular dosimetry of DNA adducts in C3H mice treated with bisphenol A diglycidylether. *Carcinogenesis*, 13, 969-972.
- Stout JT, Caskey CT (1985) HPRT: Gene, structure, expression, and mutation. *Ann Rev Genet*, 19, 127-148.
- Stout JT, Caskey CT (1988) The Lesch-Nyhan syndrome: clinical, molecular and genetic aspects. *Trends Genet*, 4, 175-178.
- Streisinger G, Okada Y, Emrich J, Newton J, Tsugita A, Terzaghi E, Inouye M (1966) Frameshift mutations and the genetic code. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 31, 77-84.
- Sun Z, Hanks CT, Fang DN, Wataha JC, Ritchie HH (1996) Expression of dentin sialoprotein (DSP) by mouse odontoblast-like cells. *J Dent Res*, 75, 250 (1857).
- Swift EJ (1989) Pulpal effects of composite resin restorations. *Oper Dent*, 14, 20-27.
- Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ (1983) The double-strand-break repair model for recombination. *Cell*, 33, 25-35.
- Tanaka K, Taira M, Shintani H, Wakasa, K, Yamaki M (1991) Residual monomers (TEGDMA and Bis-GMA) of a set visible-light-cured dental composite resin when immersed in water. *J Oral Rehabil*, 18, 353-362.
- Tansy MF, Kendall FM (1979) Update on the toxicity of inhaled methyl methacrylate vapor. *Drug Chem Toxicol*, 2, 315-330.

- Tennant RW (1993) Stratification of rodent carcinogenicity bioassay results reflect relative human hazard. *Mutation Res*, 286, 111-118.
- Tennant RW, Margolin B, Shelby M, Zeiger E, Haseman J, Spalding J, Caspary W, Stasiewicz S, Anderson B, Minor R (1987b) Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from in vitro genetic toxicity assays. *Science*, 236, 933-941.
- Tennant RW, Spalding JW, Stasiewicz S, Caspary, WD Mason J, Resnick MA (1987a) Comparative evaluation of genetic toxicity patterns of carcinogens and non-carcinogens: strategies for predictive use of short-term assays. *Environ Health Perspect*, 75, 87-95.
- Tennant RW, Zeiger E (1993) Genetic toxicology: Current status of methods of carcinogen identification. *Environ Health Perspect*, 100, 307-315.
- Thacker J (1986) The nature of mutants induced by ionizing radiation in cultured hamster cells: III. Molecular characterization of HPRT-deficient mutants induced by c-rays or α -particles showing that the majority have deletions of all parts of the hprt gene. *Mutation Res*, 160, 267-275.
- Thacker J, Chalk J, Ganesh A, North P (1992) A mechanism for deletion formation in DNA by human cell extracts: the involvement of short sequence repeats. *Nucleic Acid Res*, 20, 6183-6188.
- Thacker J, Fleck EW, Morris T, Rossiter BJB, Morgan TL (1990) Localization of deletion breakpoints in radiation-induced mutants of the hprt gene in hamster cells. *Mutation Res*, 232, 163-170.
- Thonemann B, Schmalz G, Esterbauer S, Schuster U, Schweikl H (1997) Growth kinetics of bovine pulp cell line on dentin. *J Dent Res*, 76, 78 (514).
- Tong PY, Bean TA Cobb CM, Eick JD, Yourtee DM (1996) Methacrylic acid-based monomer stimulation of mouse macrophage cells (IL-6). *J Dent Res*, 75, 315 (2381).
- Triadan H (1982) Tierexperimentelle Kurz- und Langzeituntersuchung der Dentin- und Pulpaverträglichkeit zweier neuer Komposit-Füllungsmaterialien. *Schweiz Mschr Zahnheilk*, 92, 758-765.

- Tronstad L, Spangberg L (1974) Biologic tests of a methyl methacrylate composite material. *J Dent Res*, 82, 93-98.
- Tsuchiya H, Hoshino Y, Tajima K, Takagi N (1994) Leaching and cytotoxicity of formaldehyde and methyl methacrylate from acrylic resin denture base materials. *J Prosthet Dent*, 71, 618-624.
- Tyas M (1977) A method for the in vitro toxicity testing of dental restorative materials. *J Dent Res*, 56, 1285-1290.
- Van Meerbeek B, Inokoshi S, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G (1992) Morphological aspects of the resin-dentin interdiffusion zone with different dentin adhesive systems. *J Dent Res*, 71, 1530-1540.
- Van Zeeland AA, Mohn GR, Neuhäuser-Klaus A, Ehlin U (1985) Quantitative comparison of genetic effects of ethylating agents on the basis of DNA adduct formation. Use of O⁶-ethylguanine as a molecular dosimeter for extrapolation from cells in culture to the mouse. *Environ Health Perspect*, 62, 163-169.
- Vanhoutte K, Joos P, Lemiére F, Van Dongen W, Esmans EL (1995) Thermospray liquid chromatography-mass spectrometry of the DNA adducts formed between 2'-deoxynucleosides and bisphenol A diglycidyl ether. *J Mass Spectrometry*, 30, 1453-1461.
- Venitt S, Parry JM (1984) Mutagenicity testing, a practical approach. IRL Press, Oxford, Washington DC.
- Viohl J, Dermann K, Quast D, Venz S (1986) Die Chemie zahnärztlicher Füllungskunststoffe. Carl Hanser Verlag, München.
- Voogd CE, van der Stel JJ, Jacobs JJ (1981) The mutagenic action of aliphatic epoxides. *Mutation Res*, 89, 269-282.
- Vrieling H, Simons JWIM, Arwert F, Natarajan AT, Zeeland AA (1985) Mutations induced by X-rays at the HPRT locus in cultured Chinese hamster cells are mostly large deletions. *Mutation Res*, 144, 281-286.

- Wade DR, Airy SC, Sinsheimer JE (1978) Mutagenicity of aliphatic epoxides. *Mutation Res*, 58, 217-223.
- Wade MJ, Moyer JW, Hine CH (1979) Mutagenic action of a series of epoxides. *Mutation Res*, 66, 367-371.
- Waegemaekers TH, Bensink MPM (1984) Non-mutagenicity of 27 aliphatic acrylate esters in the Salmonella-microsome test. *Mutation Res*, 137, 95-102.
- Watts A, Paterson-RC (1993) Development and harmonization of the norms and parameters in biological testing protocols designed for root canal sealing materials within the European Community. *Int Dent J*, 43, 599-605.
- Wei S-JC, Chang RL, Bhachech N, Cui XX, Merkler KA, *et al.*, (1993) Dose-dependent differences in the profile of mutations induced by (+)-7R,8S-Dihydroxy-9S,10R-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrbenzo-(a)pyrene in the coding region in the hypoxanthine (guanine) phosphoribosyltransferase gene in Chinese hamster V-79 cells. *Cancer Res*, 53, 3294-3301.
- Wei S-JC, Chang RL, Wong C-Q, Bhachech N, Cui XX, *et al.*, (1991) Dose-dependent differences in the profile of mutations by an ultimate carcinogen from benzo[a]pyrene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 11227-11230.
- Welker D, Katenkamp D, Neupert G (1977) Bindegewebsreaktionen nach Implantation von Composite-Füllungsmaterialien und Silikat-Zement. *Dtsch Zahnärztl Z*, 32, 533-536.
- Wennberg A, Mjör IA, Hensten-Pettersen A (1983) Biological evaluation of dental materials - a comparison of different test methods. *J Biomed Mater Res*, 17, 23-36.
- Williams GM (1989) Methods for evaluating chemical genotoxicity. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 29, 189-211.
- Witkowski R, Prokop O (1983) Genetik erblicher Syndrome und Mißbildungen. Akademie-Verlag, Berlin.

- Xie D, Zhang W, Cao L, Sun W, Li Z, Gao Q, Wu Y, Gao H, Yang H, Zuo J, Fang F (1990) Studies of the genotoxicity of glycidyl methacrylate (GMA). *Biomed Environ Sci*, 7, 25-34.
- Xu ZD, Yu Y-J, Hsie AW, Caskey CT, Rossiter B, Gibbs RA (1989) Deletion screening at the hypoxanthine guanine phosphoribosyl-transferase locus in Chinese hamster ovary cells using polymerase chain reaction. *Teratog Carcinog Mutagen*, 9, 177-187.
- Yen PH, Li X-M, Tsai S-P, Johnson C, Mohandas T, Shapiro LJ (1990) Frequent deletions of the human X chromosome distal short arm result from recombination between low copy repetitive elements. *Cell*, 61, 603-610.
- Yourtee DM, Smith RE, Eick JD, Kostoryz (1997) Kinetics in esterase-catalyzed hydrolysis of dimethacrylates in dentistry. *J Dent Res*, 76, 326 (2504).
- Yourtee DM, Tong PY, Rose LA, Eick JD, Chappelow CC, Bean TA (1994) The effect of spiroorthocarbonate volume modifier co-monomers on the in vitro toxicology of trial non-shrinking dental epoxy co-polymers. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 86, 347-360.
- Yu Y, Xu Z, Hsie AW (1994) Adriamycin induces large deletions as a major type of mutation in CHO cells. *Mutation Res*, 325, 91-98.
- Yu Y-J, Xu Z, Gibbs R, Hsie AW (1992) Polymerase chain reaction-based comprehensive procedure for the analysis of the mutation spectrum at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase locus in Chinese hamster cells. *Environ Mol Mutagen*, 19, 267-272.
- Yumibe N, Huie K, Chen KJ, Snow M, Clement RP, Cayen MN (1996) Identification of human liver cytochrome P450 enzymes that metabolize the non-sedating antihistamine loratadine. Formation of descarboethoxyloratadine by CYP3A4 and CYP2D6. *Biochem Pharmacol*, 26, 165-172.

- Zeiger E, Anderson B, Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K, Speck K (1987) Salmonella mutagenicity tests III. Results from the testing of 255 chemicals. Environ Mutagenesis, 9 (Suppl 9), 1-110.
- Zhang L-H, Jenssen D (1991) Site specificity of N-methyl-N-nitrosourea-induced transition mutations in the hprt gene. Carcinogenesis, 12, 1903-1909.
- Zhang L-H, Vrieling H, Zeeland AA, Jenssen D (1992) Spectrum of spontaneously occurring mutations in the hprt gene of V79 Chinese hamster cells. J Mol Biol, 223, 627-635.